

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Thomas Kirchner

**„Überprüfung der Theorie der dualen Tumorgenese bei serösen
Ovarialkarzinomen: Immunhistochemische und
molekularpathologische Untersuchungen am Subtyp des High
Grade serösen Ovarialkarzinoms“**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Felix Rieger

aus Weingarten

2018



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Doris Mayr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Miriam Lenhard
Prof. Dr. med. Hans-Joachim Stemmler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.03.2018

Eidesstattliche Versicherung

Rieger, Felix

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Überprüfung der Theorie der dualen Tumorgenese bei serösen
Ovarialkarzinomen: Immunhistochemische und
molekularpathologische Untersuchungen am Subtyp des High
Grade serösen Ovarialkarzinoms“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 06.07.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Themaeinführung	6
1.2	Tumor allgemein	6
1.3	Ovarialkarzinom: Epidemiologie	9
1.4	Ätiologie	10
1.4.1	Risikofaktoren und protektive Faktoren	10
1.4.2	Entstehungstheorien	11
1.4.3	Pathogenese des Ovarialkarzinoms	13
1.5	Molekulare Genetik	20
1.5.1	Tumorsuppressorgene	20
1.5.2	p53	21
1.5.3	p16	23
1.5.4	Onkogene	24
1.5.5	KRAS und BRAF	24
1.5.6	Familiäres Ovarialkarzinom	27
1.5.7	BRCA1/ BRCA2 und Rad51c	27
1.5.8	Andere beteiligte Gene beim familiären Ovarialkarzinom	29
1.6	Klinik	30
1.6.1	Symptome	30
1.6.2	Diagnostik	30
1.6.3	Krankheitsstadien (TNM, FIGO)	31
1.6.3	Therapie	34
1.6.4	Prognose:	37
1.7	Histologische Klassifikation	38
2	Zielsetzung und Fragestellung	41
3	Material und Methoden	42
3.1	Patientenkollektiv	42
3.1.1	FFPE-Material	42
3.1.2	Leerschnitte	43
3.2	Immunhistochemie (IHC) für p53 und p16	43
3.3	Pyrosequenzierung	48
3.3.1	HE-Färbung	48

3.3.2	DNA-Isolierung des Tumormaterials	49
3.3.3	Entparaffinierung der Leerschnitte	49
3.3.4	Auskratzen der Leerschnitte	49
3.3.5	Tumor-DNA-Isolierung im QiaCube	50
3.3.6	DNA-Gelelektrophorese	55
3.3.7	Durchführung der Pyrosequenzierung	56
4	Ergebnisse	60
4.1	Immunhistochemie p53 und p16:	60
4.1.1	Ergebnisse der p53-Immunhistochemie	60
4.1.2	Ergebnisse der p16-Immunhistochemie:	62
4.2	Mutationsanalysen	65
4.2.1	KRAS	65
4.2.2	BRAF	67
4.2.3	Ergebnisse LGSC aus demselben Kollektiv (Hartmann & Mayr et al., 2015)	68
4.2.4	Übersicht aller 152 untersuchten HGSC	70
5	Diskussion	75
6	Zusammenfassung	84
7	Anhang	87
7.1	Lebenslauf:	Fehler! Textmarke nicht definiert.
7.2	Danksagung:	87
7.3	Verzeichnisse	88
7.3.1	Geräte	88
7.3.2	Verbrauchsmaterialien	89
7.3.3	DNA-Isolation:	89
7.3.4	Gel-Elektrophorese	89
7.3.5	Pyrosequenzierung	89
7.3.6	Software	90
7.3.7	Abbildungsverzeichnis	91
7.3.8	Tabellenverzeichnis	92
7.3.9	Literaturverzeichnis	93

1 Einleitung

1.1 Themaeführung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem High Grade serösen Ovarialkarzinom, das die häufigste Unterart des Ovarialkarzinoms darstellt (80%). Es sollen die vier Gene TP53, TP16, KRAS und BRAF auf Mutationen untersucht werden. Dabei wird die Theorie der dualen Tumorgenese überprüft. Diese besagt, dass für das seröse Ovarialkarzinom zwei unterschiedliche Mutationswege für die Entstehung charakteristisch sind. Das High Grade seröse Ovarialkarzinom (HGSC) wird durch Mutationen der Tumorsuppressorgene TP53 und TP16 charakterisiert, während sich im serösen Low Grade- Ovarialkarzinom (LGSC) typischerweise Mutationen der Protoonkogene KRAS und BRAF finden. Durch diesen obligat unterschiedlichen molekulargenetischen Entstehungsweg werden das LGSC und das HGSC in der Literatur als zwei unterschiedliche Entitäten angesehen. In der vorliegenden Arbeit soll nun überprüft werden, ob diese Theorie der dualen Tumorgenese valide ist und ob sie eventuell ergänzt oder erweitert werden kann.

1.2 Tumor allgemein

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit und sind in den Industrieländern die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen. Laut Studien entwickelt jeder zweite Mensch in den Industrieländern im Laufe seines Lebens eine Krebserkrankung (Greaves, 2015). Dieser Prozess geschieht nicht plötzlich, sondern infolge komplexer genetischer und epigenetischer Veränderungen über Jahre und Jahrzehnte hinweg (Gerlinger et al., 2014). Obwohl einige Krebsarten auch in jungen Jahren auftreten können, so gilt Krebs doch als Krankheit des Alters (Anand, Sundaram, Jhurani, Kunnumakkara, & Aggarwal, 2008). Das Wort Krebs bzw. Karzinom kommt von dem griechischen Wort „karkinos“, das von dem antiken griechischen Arzt Hippokrates (460-370 vor Christus) geprägt wurde. Eine der frühesten Erwähnungen von Brustkrebs stammt aus dem Jahr 1600 vor Christus aus dem alten Ägypten. Der Papyrus enthält eine Beschreibung verschiedener Krebserkrankungen und erwähnt die operative Entfernung von Brustkrebs. Zudem wird erwähnt, dass es keine Heilung für diese Erkrankung gebe. Die älteste Therapie ist die chirurgische Exzision, die schon seit Jahrtausenden bekannt ist. Nach der Erfindung der Anästhesie im Jahr 1846 entwickelten mehrere bekannte Chirurgen wie Bilroth, Handley und Halsted

Krebsoperationen mit begleitender Lymphonodektomie. Der Chirurg Paget beschrieb, dass Krebszellen über das Blut in andere Körperareale gelangen können (Sudhakar, 2009). Durch neue minimalinvasive und schonende Verfahren wurden die alten radikalen Operationen zunehmend abgelöst, wie etwa die radikale Mastektomie durch die brusterhaltende Operation. Die mitunter aus den großen Kriegen des 20. Jahrhunderts stammenden Kenntnisse über Chemotherapeutika (Senfgas im I. Weltkrieg) und Strahlentherapie (Opfer der Atombombenabwürfe über Hiroshima und Nagasaki im II. Weltkrieg) wurden bis heute zunehmend effektiver und nebenwirkungsärmer gestaltet (Chabner & Roberts, 2005). Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde die Entstehung von Krebs aufgrund neuer molekularbiologischer Kenntnisse besser verstanden. Auch zielgerichtete Therapien, zum Beispiel durch die Blockade von Wachstumsfaktoren oder von Pathways, die für die Proliferation der Zelle verantwortlich sind (DeVita & Chu, 2008) erfuhren erstmals höhere Aufmerksamkeit.

Um dieser großen medizinischen Herausforderung wirksam entgegenzutreten zu können, ist es von enormer Bedeutung, die molekularen Entstehungsprozesse zu verstehen. Hierzu wurde im Jahr 2000 eine vielbeachtete Arbeit zu den wichtigsten Grundlagen der Entstehung maligner Tumoren veröffentlicht: Die „Hallmarks of Cancer“ von Hanahan und Weinberg. Die Autoren beschreiben 6 grundlegende Kennzeichen, die maligne Tumoren definieren und eine Abgrenzung zu den benignen Tumoren erlauben.

6 Kennzeichen von Krebs (Hanahan & Weinberg, 2000):

1. Resistenz gegenüber Apoptose
2. Induktion der Angiogenese
3. Uneingeschränktes replikatives Wachstumspotential
4. Aktivierung von Gewebeinvasion und Metastasierung
5. Resistenz gegenüber Wachstumssuppressoren
6. Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen

Im Jahr 2011 ergänzten die Autoren diese Kennzeichen um weitere Aspekte (Hanahan & Weinberg, 2011):

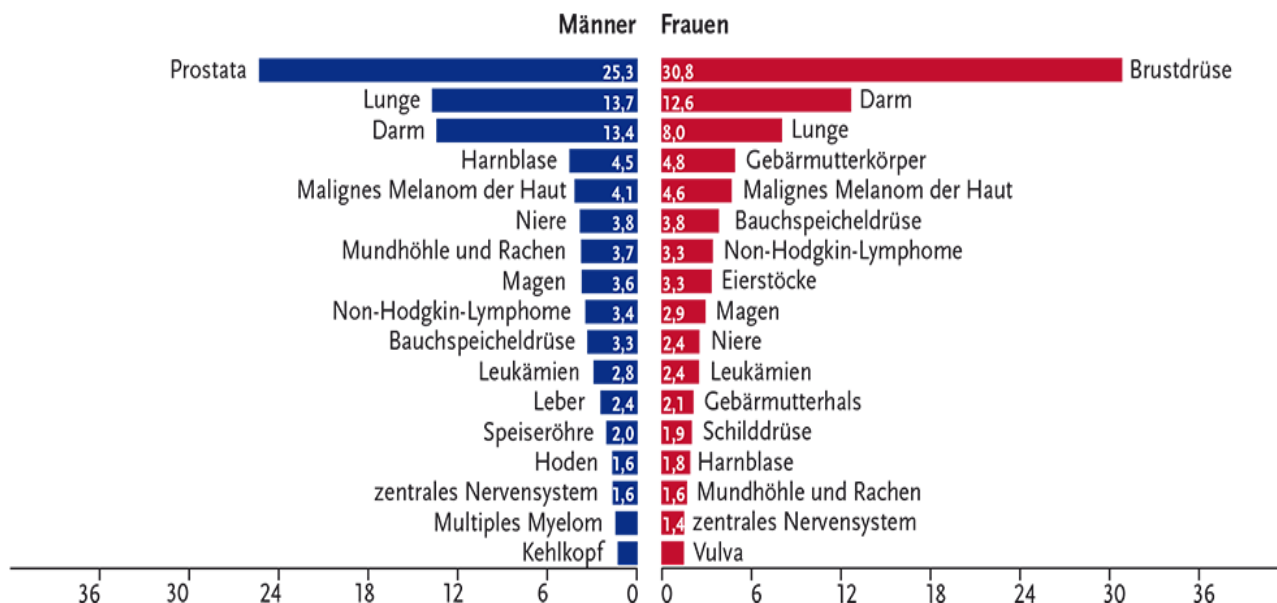
1. Schaffung einer tumorfreundlichen Umgebung („tumor microenvironment“, TME). Die Zellen, die sich in direkter Nachbarschaft zu den Krebszellen befinden, schaffen ein Milieu, das Angiogenese, Proliferation und Metastasierung fördert.
2. Krebszellen können das Immunsystem des Körpers durch Ausschüttung immunmodulatorischer Faktoren wie regulatorischer T-Zellen oder immunsuppressiver Chemokine umgehen. Die körperliche Immunantwort bleibt aus.
3. Hochgradige genomische bzw. chromosomale Instabilität.
4. Lokale chronische Entzündungen. Diese können eine Vielzahl an Krebsarten begünstigen.
5. Etablierung abnormer metabolischer Stoffwechselwege. Beispielsweise ermöglicht dies die Proliferation auch in hypoxischem Gewebe durch einen anaeroben Stoffwechsel (Warburg-Effekt).

Diese und zahlreiche weitere Arbeiten legen den Grundstein für das Verständnis der genetischen und molekularbiologischen Mechanismen der Krebsentstehung und ermöglichen so die Entwicklung neuartiger zielgerichteter Medikamente.

Auch für das Ovarialkarzinom ist ein möglichst genaues Verständnis der Entstehung der verschiedenen Unterarten zur Entwicklung wirksamer chirurgischer und medikamentöser Therapien von höchster Bedeutung, um die meist immer noch sehr schlechte Prognose in Zukunft entscheidend zu verbessern. Mit der vorliegenden Arbeit soll durch die Überprüfung der Theorie der dualen Tumorgenese zu einem besseren Verständnis der Entstehung der epithelialen serösen Tumoren beigetragen werden.

1.3 Ovarialkarzinom: Epidemiologie

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (Robert Koch-Institut, 2015)



Das Ovarialkarzinom ist verglichen mit allen Krebsarten das achthäufigste Malignom der Frau in Deutschland (Robert Koch-Institut, 2015). Bezogen auf gynäkologische Malignome ist das Ovarialkarzinom das dritthäufigste Genitalmalignom der deutschen Frau nach dem Endometrium- und dem Cervixkarzinom und der fünfthäufigste stationär behandelte Tumor bezogen auf alle Tumorarten der Frau in Deutschland.

Das Ovarialkarzinom ist in Deutschland die fünfthäufigste malignombedingte Todesursache (Destatis, 2014). Im Rahmen der 5-Jahres-Prävalenz ergeben sich 21 300 betroffene Frauen, erhoben im Jahr 2012.

In Deutschland gab es im Jahr 2012 etwa 7380 Neuerkrankungen (3,3% aller bösartigen Neubildungen der Frauen) und eine durchschnittliche Erkrankungsrate von 18 je 100 000 über alle Altersgruppen hinweg. Das mittlere Erkrankungsalter lag im Jahr 2012 bei 69 Jahren. Durch das Ovarialkarzinom starben 2012 etwa 5646 Patientinnen, was etwa 5,6% aller Krebssterbefälle ausmacht. Das Ovarialkarzinom ist vor allem eine Erkrankung des Alters. Mit steigendem Alter erhöht sich das Risiko kontinuierlich. Während eine Frau im Alter von 35 Jahren ein Risiko von 0,1% hat, in den nächsten 10 Jahren an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, liegt das Risiko bei

einer 65-jährigen bei 0,4%. Der Häufigkeitsgipfel der Neuerkrankungsrate liegt bei 80-84 Jahren mit etwa 55 Erkrankungen je 100 000 Frauen. Über 85 Jahren sinkt das statistische Risiko wieder leicht.

Die altersstandardisierte Sterberate sank in den letzten 10 Jahren leicht, nämlich von ca. 9 je 100 000, also knapp 6000 Betroffenen im Jahr 1998 auf 7,8 je 100 000, also etwa 5800 Frauen im Jahr 2012. Eine Ursache für die schlechte Prognose ist die Tatsache, dass die Diagnose in vielen Fällen erst spät gestellt werden kann. In 61% der Fälle befindet sich die Patientin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im T3-Stadium. Auf die TNM-Klassifikation des serösen Ovarialkarzinoms wird im Kapitel Klinik (1.6.3) genauer eingegangen.

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag im Jahr 2012 bei 41%. Im internationalen Vergleich bewegt sich Deutschland in Bezug auf die Neuerkrankungs- und Sterblichkeitsrate im Mittelfeld (Robert Koch-Institut, 2015).

1.4 Ätiologie

1.4.1 Risikofaktoren und protektive Faktoren

Auf die Entstehung des Ovarialkarzinoms haben verschiedene Faktoren Einfluss. Neben einem höheren Lebensalter und einer fettreichen Ernährung ist auch Adipositas ein Risikofaktor. Patientinnen mit der höchsten WHO-Stufe der Adipositas weisen ein bis zu 30% erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines epithelialen Ovarialkarzinoms auf. Frauen mit moderatem Übergewicht tragen ein um 16% erhöhtes Risiko (Olsen et al., 2007). Auch Sport und die körperliche Aktivität spielen eine Rolle. Von einer Verbesserung dieser beeinflussbaren „Lifestyle“-Faktoren profitieren die Patientinnen sowohl in der Prävention als auch bei bereits bestehendem Ovarialkarzinom (Beavis, Smith, & Fader, 2016).

Außerdem erhöht sich das Risiko durch den frühen Eintritt der Menarche und ein spätes Klimakterium sowie Unfruchtbarkeit und Kinderlosigkeit bzw. wenige Schwangerschaften. Eine Rolle spielt auch eine Östrogenmonotherapie nach den Wechseljahren. Eine protektive Wirkung entfaltet sich umgekehrt durch Multiparität und lange Stillzeiten, die langjährige Einnahme hormoneller Kontrazeptiva sowie eine späte Menarche und ein frühes Klimakterium. Auch ein Zustand nach Hysterektomie oder Tubenligatur senkt das Risiko. Trotz ihrer wichtigen Rolle bei der Entstehung

des Ovarialkarzinoms haben anamnestische hormonelle Einflussfaktoren wie die Einnahme hormoneller Kontrazeptiva, der Z.n. Tubensterilisation oder Hysterektomie oder die Gebärfähigkeit keine lebensverlängernde Wirkung bei manifestem Ovarialkarzinom (Nagle, Bain, Green, & Webb, 2008).

Zugrunde liegt diesen Einschätzungen die Annahme, dass das Risiko für die Entstehung des Ovarialkarzinoms durch eine hohe Anzahl an Ovulationen steigt, während eine geringere Anzahl an Ovulationen das Risiko senkt (Purdie, Bain, Siskind, Webb, & Green, 2003).

1.4.2 Entstehungstheorien

Zu den molekularbiologischen Entstehungswegen des Ovarialkarzinoms gibt es verschiedene Erklärungsmodelle.

Subjektive Krankheitstheorien

Zu den subjektiven Krankheitstheorien der Patientinnen gehören vor allem privater Stress (58,7%), genetische Prädisposition (35,8%), beruflicher Stress (30,4%) und hormonelle und Umwelteinflüsse (je 29,3%) (Mueller & Sehouli, 2006).

Objektive Krankheitstheorien

Zu den älteren Entstehungstheorien gehören die Ovulationshypothese und die Gonadotropinhypothese.

1. Ovulationshypothese

Bei der Ovulationshypothese wird davon ausgegangen, dass die Zellen des Oberflächenepithels durch die häufigen Eisprünge im Rupturbereich einem ständigen Kreislauf aus Verletzungen und Vernarbungen unterliegen. Über die Zeit hinweg erleiden die Epithelzellen einen irreparablen Schaden. Bei der Einleitung des Zelluntergangs werden unter anderem mutagene Substanzen frei. Diejenigen Zellen, die nicht korrekt von den Reparatursystemen der DNS erfasst werden, bilden die Grundlage für eine etwaige Entartung. Des Weiteren bilden sich Inklusionszysten mit eingeschlossenem epitheliale Gewebe. Innerhalb dieser Inklusionszysten findet die Entartung der Zellen statt, u.a. durch ein verändertes hormonelles Umfeld (Yang-Hartwich et al., 2014).

2. Gonadotropinhypothese

Bei der Gonadotropinhypothese geht es darum, dass dauerhaft erhöhte Serumspiegel von Dehydroepiandrosteron (DHEA) über eine pathologische Dauerstimulation des ovariellen Oberflächenepithels zu einem erhöhten

Entartungsrisiko führen. Die Entartung findet dabei auf der Oberfläche des Epithels oder in Inklusionszysten statt (Berliner Tumorzentrum TMZ, 2012).

Aktuellere Theorien

In aktuelleren Entstehungstheorien wird der Entstehungsweg von Typ-I- und Typ-II-Neoplasien unterschieden.

Low grade (Typ-I)

Bei Typ-I-Neoplasien (Low-Grade-Karzinome, LGSC) handelt es sich vorwiegend um endometrioseassoziierte klarzellige und endometrioide Karzinome. Hier spielen Mutationen der Protoonkogene KRAS und BRAF als sogenannte aktivierende Mutationen eine entscheidende Rolle.

High grade (Typ-II)

Bei Typ-II-Tumoren (High-grade-Karzinome) handelt es sich in >80% um High Grade seröse Karzinome (HGSC). Hier spielen neben anderen in besonderem Maße Mutationen in den Tumorsuppressorgenen TP53 und TP16 als sogenannte inaktivierende Mutationen eine wichtige Rolle.

Implantat-Theorie

Es mehren sich die Hinweise, dass ein Teil der epithelial-stromalen Ovarialtumoren auf Vorläuferläsionen in den Tuben zurückzuführen ist. Diese Vorläuferläsionen werden als seröse tubare intraepiteliale Karzinome (STIC) bezeichnet.

Tumorstammzelltheorie des Ovarialkarzinoms

Als weitere Entstehungstheorie ist die Tumorstammzelltheorie zu nennen. In den vergangenen Jahren konnten Zellen mit Stammzellcharakter im Ovarialkarzinom nachgewiesen werden. Diese Stammzellen könnten eine Erklärung für die häufige Therapieresistenz der Ovarialkarzinome darstellen. In Zellen aus Aszites und soliden Tumoranteilen wurde festgestellt, dass die ovariellen Krebsstammzellen (OCSCs) durch die Oberflächenmerkmale CD44+, MyD88+, konstitutive NFkappaB-Aktivität und Zytokin- und Chemokinproduktion charakterisiert sind (Alvero et al., 2009). Es wird von einer hierarchischen Tumorstruktur ausgegangen. Nur die CSC („cancer stem cells“) haben tumorigenes Potential, sie sind umgeben von unterschiedlich differenzierten Tumorzellen. Sie besitzen die Fähigkeit zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen (Vochem, Eienkel, Horn, & Ruschpler, 2014).

Diese Stammzellen können sich dauerhaft selbst erneuern und sind resistent gegenüber konventioneller Chemotherapie und Radiotherapie. Sie bilden ein

Reservoir, das den Tumor trotz Therapie am Leben erhält und gelten daher als wichtige Ursache für Tumorrezidive nach Beendigung der Therapie (Yang, Liu, & Huang, 2016).

Keimbahnmutationen

Im Rahmen von vererbten Syndromen kann es ebenfalls zum Ovarialkarzinom kommen.

Die wichtigste Keimbahnmutation betrifft die Tumorsuppressorgene BRCA 1 und 2. Frauen mit einer Mutation in einem der beiden Gene haben ein deutlich erhöhtes Risiko, ein Mammakarzinom oder ein Ovarialkarzinom zu entwickeln. Hierauf wird detailliert im Kapitel 1.5.6 eingegangen.

Ein weiteres Beispiel für eine Keimbahnmutation ist das autosomal-dominant vererbte Li-Fraumeni-Syndrom, bei dem es sich um eine Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen TP53 handelt. Hierbei kommt es neben zahlreichen Tumorkrankheiten auch zu einer erhöhten Rate an Ovarialkarzinomen (Nichols, Malkin, Garber, Fraumeni, & Li, 2001). Auch beim autosomal-dominant vererbten HNPCC (Lynch-Syndrom), kann es zur Entstehung von serösen Ovarialkarzinomen kommen. Dem Lynch-Syndrom liegen verschiedene Keimbahnmutationen aus der Gruppe der DNA-Mismatch-Reparaturproteine zugrunde, etwa in den Genen hMSH2 (31 %) und hMLH1 (33 %). Insbesondere beim Vorliegen eines familiären Lynch II-Syndroms liegt das kumulative Risiko, an einem HGSC zu erkranken bei über 12% (Prat, Ribe, & Gallardo, 2005).

1.4.3 Pathogenese des Ovarialkarzinoms

Die Genese des epithelialen Ovarialkarzinoms ist nicht abschließend geklärt und Gegenstand intensiver weltweiter Forschung. An dieser Stelle wird der Fokus auf das seröse Karzinom gelegt, das Gegenstand dieser Arbeit ist.

In der Literatur finden sich zahlreiche Theorien zur Entstehung des Ovarialkarzinoms. Eine davon ist die Theorie der sogenannten dualen Tumorgenese, die von Malpica 2004 propagiert wurde. Diese besagt, dass das LGSC und das HGSC zwei verschiedene Karzinome mit unterschiedlichem molekularpathologischem Entstehungsweg sind. Für die Entstehung des LGSC ist demnach typischerweise eine Mutation in einem der Onkogene KRAS oder BRAF vonnöten, während das HGSC durch eine Mutation des Tumorsuppressors TP53 gekennzeichnet ist. Auf die

Theorie der dualen Tumorgenese wird weiter unten in diesem Kapitel noch ausführlich eingegangen.

Ehe die Einteilung in ein Low Grad Karzinom und ein High Grade- Karzinom festgelegt wurde, hatte sich zunächst ein dreistufiges System etabliert.

Dieses wurde durch die Arbeitsgruppe um Shimizu und Silverberg Ende der 90er Jahre propagiert. Dabei wurden verschiedene histologische Kriterien herangezogen wie zum Beispiel das Wachstumsmuster der Zellen, die Kerngröße, die Kern-Zytoplasma-Relation und die mitotische Aktivität. Die Karzinome wurden in Grad I, II und III eingeteilt (Shimizu et al., 1998), (Silverberg, 2000).

Im Jahr 2004 schlugen Anais Malpica und Kollegen vom MD Anderson Cancer Centre ein zweistufiges Grading-System des serösen Ovarialkarzinoms vor. Diese Idee beruhte zum einen auf der oben erwähnten Theorie der dualen Tumorgenese mit den zwei unterschiedlichen molekularen Entstehungswegen und zum anderen auf dem typischen klinischen Verlauf der Karzinome.

Denn die Patientinnen mit G1- Tumoren wiesen das längste progressionsfreie Überleben auf, während die G2- und G3- Tumoren ein deutlich kürzeres Überleben zeigten. Dabei bestand kein signifikanter Überlebensunterschied zwischen den G2- und G3- Tumoren, was ebenfalls dafür sprach, dass es sich um zwei statt drei verschiedene Gruppen handeln könnte (Bodurka et al., 2012).

Die histologische Klassifikation in ein zweistufiges Grading-System von Malpica stützt sich auf die Zellkernpleomorphie und die mitotische Aktivität. Die Arbeitsgruppe verglich ihr neues vereinfachtes System unter anderem mit dem Grading-System von Silverberg und Shimizu.

Hierbei wurden die ehemals als Grad I klassifizierten Tumoren als Low Grade und die Grad II- und Grad III-Tumoren als High Grade bezeichnet. Auch andere Autoren konnten zeigen, dass das Grad II-Karzinom molekulargenetisch und histologisch zu etwa 80% dem Grad III-Karzinom entspricht (Ayhan et al., 2009).

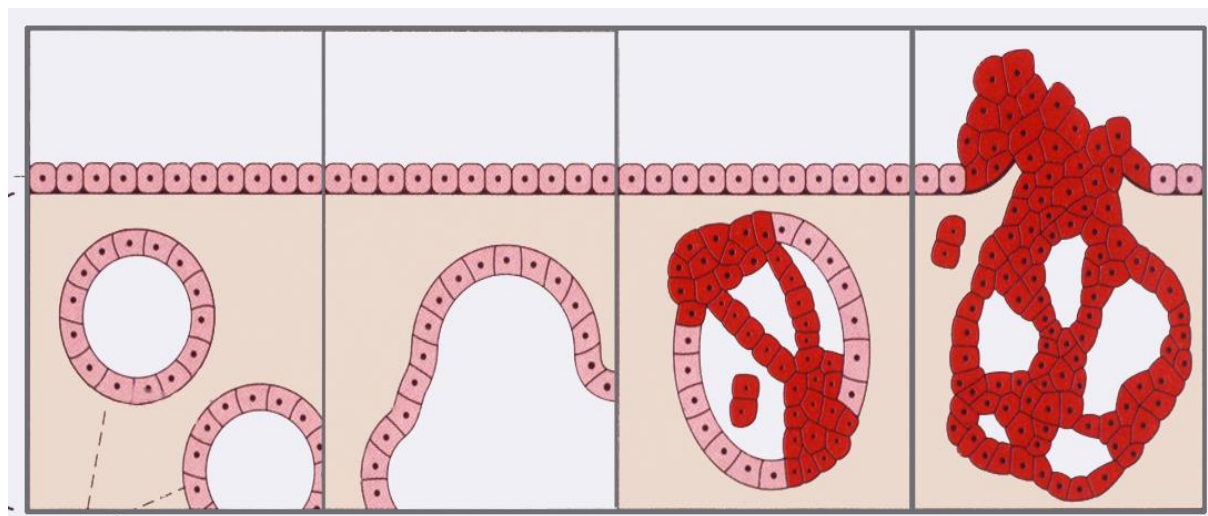
Somit wird nur noch ein Typ I und ein Typ II unterschieden (Malpica et al., 2004).

In einer Überprüfung aus dem Jahr 2007 zeigte Malpica, dass ihr zweistufiges System dem dreistufigen System in der Praxis überlegen ist, da es gut mit ihm korreliert und dabei noch einfacher erlernbar und anwendbar ist (Malpica et al., 2007). Dieses zweistufige System beschränkt sich jedoch auf den serösen Subtyp des Ovarialkarzinoms.

Auf dem 97. Pathologenkongress in Heidelberg 2013 wurde von unserer Arbeitsgruppe ein erneuter Vergleich zwischen dem zweistufigen und dem dreistufigen Grading-Modell vorgestellt. Hierbei wurde abermals bestätigt, dass das zweistufige System nach Malpica benutzerfreundlicher, einfacher zu erlernen und leicht reproduzierbar ist. Für die Graduierung war das zweistufige System in der Untersuchung viel signifikanter als das dreistufige System (S. Hartmann & D. Mayr et al., 2013). Heute gilt es als gesichert, dass mit dem Typ I, dem Low Grade- Karzinom und dem Typ II, dem High Grade- Karzinom, zwei unterschiedliche Tumorentitäten vorliegen, und nicht etwa zwei Varianten derselben Neoplasie (McCluggage, 2011). Diese Entitäten folgen einem jeweils unterschiedlichen Entstehungsweg.

Beim Typ I, dem LGSC, wird davon ausgegangen, dass sich Inklusionszysten mit zunächst normalem Epithel bilden, das dann entartet und sich über ein Zystadenom zum Borderlinetumor entwickelt. Der Borderlinetumor kann dann selten in ein invasives Low Grade- Ovarialkarzinom übergehen (siehe Abbildung 2). Es handelt sich also um eine Adenom- Karzinom- Sequenz (McCluggage, 2008). Beim Typ I- Karzinom sind diese Vorläuferläsionen eindeutig im Ovar beschrieben. Der Typ I umfasst das endometrioides, klarzellige, muzinöse, LGSC und Transitionalzellkarzinom (Koshiyama, Matsumura, & Konishi, 2014). Der Typ I- Pathway ist ein langsamer, schrittweiser Prozess, während der Typ II-Pathway schneller abläuft und eine deutlich schlechtere klinische Prognose hat (Vang, Shih Ie, & Kurman, 2009).

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung von Low Grade- Ovarialtumoren (modifiziert).
(Riede & Schaefer et. al., 2004).



- a) Normales Oberflächenepithel der Inklusionszysten b) Zystadenom c) Borderlinetumor d) invasives Karzinom

Eine Theorie über den Ursprung des Typ II-Karzinoms besagt, dass dieses direkt aus dem Epithel der kortikalen Inklusionszysten oder aus einer sogenannten Vorläuferläsion des ovariellen Oberflächenepithels entsteht (Feeley & Wells, 2001).

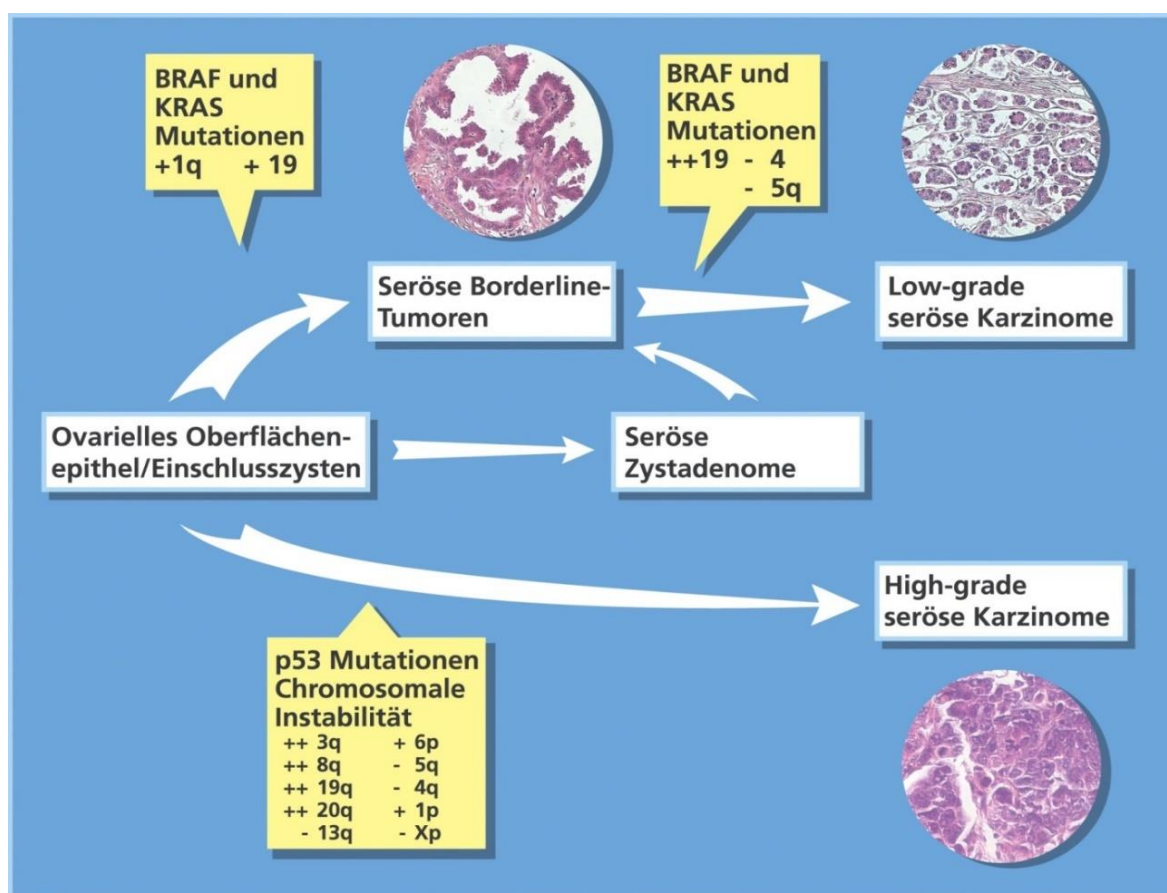
Diese Vorläuferläsion ist jedoch nicht klar beschrieben und schwierig im Ovar zu identifizieren. Daher wurde angenommen, dass die Typ II-Tumoren sich „de novo“ aus dem Epithel entwickeln (Vang et al., 2009). Sie umfassen die HGSC, undifferenzierten Karzinome und die Karzinosarkome. Selten gibt es jedoch auch Typ II- Tumoren, die sich aus Borderlinetumoren entwickeln (Dehari, Kurman, Logani, & Shih le, 2007).

Dieser unterschiedliche Entstehungsweg spiegelt sich auch im Mutationsmuster wider. Beim Typ I- Ovarialkarzinom findet sich typischerweise eine Mutation des Protoonkogens KRAS oder BRAF oder von ERBB2, einer Rezeptortyrosinkinase, die wie KRAS und BRAF die Proliferation der Zelle fördert (Ayhan et al., 2009). Dabei fehlen TP53- und TP16-Mutationen (Singer et al., 2003), (Mayr, Hirschmann, Lohrs, & Diebold, 2006), (Acs, 2005), (Tsang et al., 2013).

Beim Typ II-Pathway hingegen werden typischerweise TP53 und TP16- Mutationen gefunden, während KRAS-, BRAF- und ERBB2- Mutationen fehlen (O'Neill et al.,

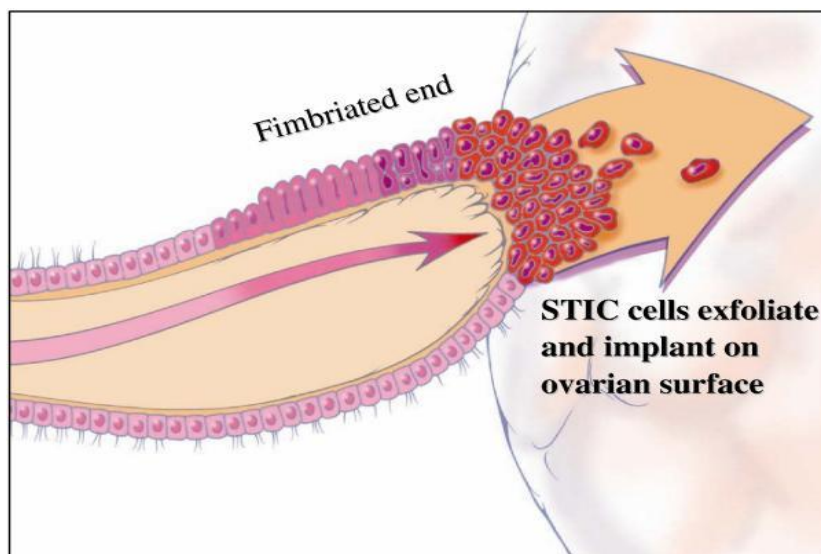
2007), (O'Neill, Deavers, Malpica, Foster, & McCluggage, 2005), (Phillips, Kelly, & McCluggage, 2009), (Kurman, 2013), (Ayhan et al., 2009), (Vang et al., 2009). Ein Kennzeichen des HGSC ist, dass es hochgradig genetisch bzw. chromosomal instabil ist (Kurman & Shih le, 2011). Im Folgenden wird der duale Entstehungsweg des Typ I- und Typ II- Karzinoms nach Diebold und Stäbler aus dem Jahre 2005 veranschaulicht.

Abbildung 3: Dualer Weg der Tumorgenese bei serösen Ovarialkarzinomen modifiziert nach Diebold (Stäbler & Diebold, 2005).



In den letzten 10-15 Jahren wurden in zahlreichen Forschungsarbeiten die Tuben als Ursprungsort des HGSC diskutiert. Dieser Prozess wird SCAT genannt (seröse Karzinogenese in der Tube) (Jarboe et al., 2008) mit primärer Ausbildung eines sogenannten serösen tubaren intraepithelialen Karzinoms (STIC). Diese sich im distalen Tubenabschnitt befindenden Zellen unterliegen einer malignen Transformation (TILT= tubare intraepitheliale Läsion in Transition) (Watkin & Devouassoux-Shisheboran, 2011) und wandern ins Ovar ein. Somit wären die HGSC-Zellen nicht ovariellen Ursprungs, sondern vielmehr als „Metastasen“ der STICs der distalen Tube anzusehen (Koshiyama et al., 2014).

Abbildung 4: STIC-Zellen aus dem Bereich der tubaren Fimbrien „metastasieren“ auf die Oberfläche des Ovars. Schaubild nach Kurman et al (Kurman & Shih le, 2010).



Erstmals entdeckt wurde dieser Umstand in einem anderen Zusammenhang. Die Bemühungen, bei BRCA- positiven Frauen das Krebsrisiko zu senken, führten zur Praxis der prophylaktischen Salpingo-Oophorektomie. Bei Untersuchungen dieser Präparate wurden überraschenderweise in >70% der Fälle STICs gefunden. 93% der STICS befanden sich im Fimbrienkranz. (Kindelberger et al., 2007), (Watkin & Devouassoux-Shisheboran, 2011). Nach der neuen WHO-Klassifikation von 2014 gilt zumindest für die BRCA1-positiven HGSC als gesichert, dass sie als Metastase der STIC angesehen werden können (Meinhold-Heerlein et al., 2016).

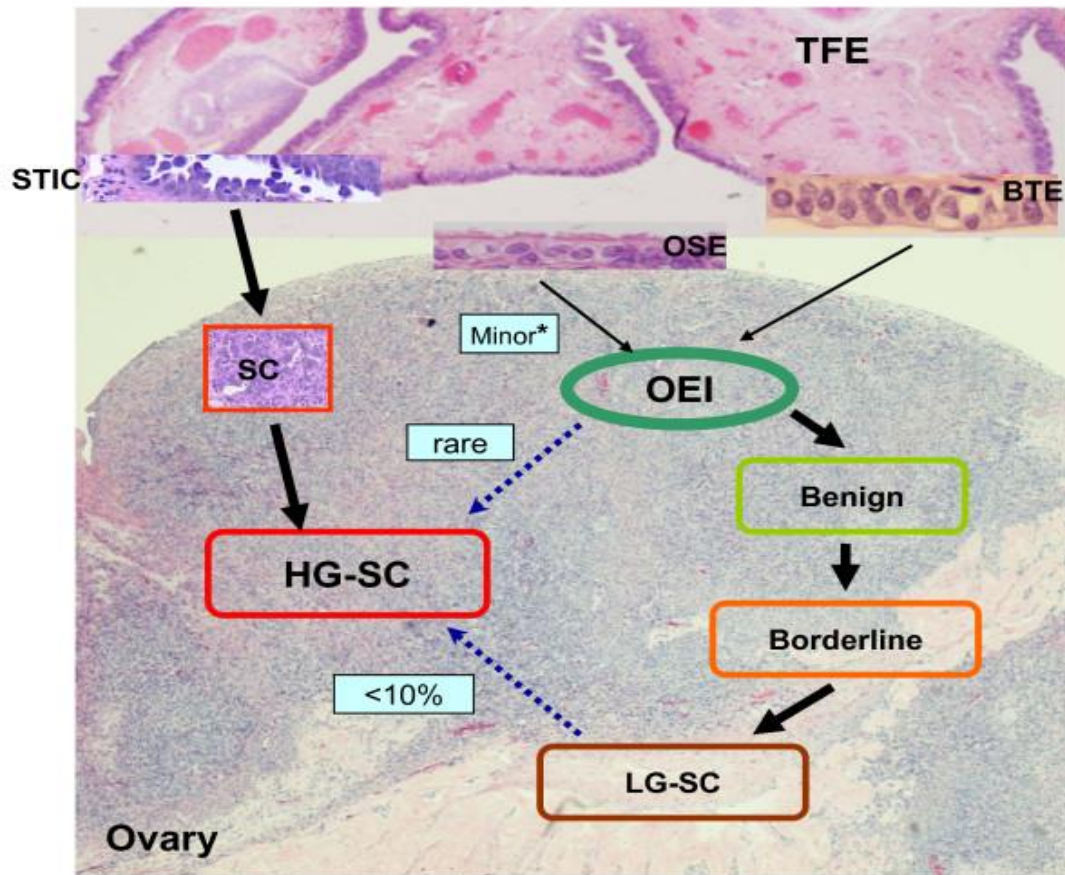
In den STICs wurden in vielen Fällen dieselben p53-Mutationen wie in den Ovarialkarzinomzellen gefunden (Y. Lee et al., 2007). Man spricht von der sogenannten p53-Signatur (H. X. Li et al., 2014), (Leonhardt, Einkenkel, Sohr, Engeland, & Horn, 2011). Als p53-Signatur bezeichnet man Zellen, die p53-positiv sind und in etwa 10% der Fälle ein erhöhtes Ki67 aufweisen. Sie sind jedoch histologisch unauffällig (E. Y. Chen et al., 2010), (Mehra et al., 2011). Die p53-Signatur und ihr maligner Gegenpart, die STIC weisen auf die Bedeutung der Fimbrien sowohl als möglichen Entstehungsort des serösen Karzinoms als auch als Zielstruktur für den frühen Nachweis und die Prävention dieser Krankheit hin (Y. Lee et al., 2007).

Falls definitiv bestätigt hätten werden kann, dass das STIC die früheste Form des HGSC darstellt, so hätte dies großen Einfluss auf das Screening, die Behandlung und die Prävention (Przybycin, Kurman, Ronnett, Shih le, & Vang, 2010). In diesem

Zusammenhang käme der (alleinigen) prophylaktischen Salpingektomie eine noch weitaus größere Bedeutung zu, als bislang bekannt (Kurman & Shih le, 2011). Ob diese Maßnahme bei Patientinnen mit nachgewiesenem STIC die Mortalität signifikant senkt, bedarf jedoch weiterer Studien (Reade et al., 2014).

Das folgende Schaubild stellt eine Übersicht über die Entstehungstheorien des LGSC und HGSC dar. Gesichert ist dies wie oben erwähnt gemäß der WHO von 2014 nur für das BRCA-1-positive HGSC. In den tubaren Fimbrien (TFE) am distalen Ende der Tube befindet sich demnach der häufigste Entstehungsort des serösen Karzinoms. Benignes tubares Epithel bildet ovarielle Inklusionen, aus dem sich über einen Borderlinetumor schließlich ein LGSC entwickelt. Nur ein kleiner Teil der Inklusionen entwickelt sich aus dem ovariellen Oberflächenepithel (OSE). Es wird auch davon ausgegangen, dass die vom OSE stammenden Inklusionen nicht in der Lage sind, sich zum LGSC zu transformieren. Das HGSC dagegen entwickelt sich überwiegend aus dem serösen tubaren intraepithelialen Karzinom (STIC). Die vom STIC stammenden Zellen lagern sich an die Oberfläche des Ovars an oder dringen in das Stroma ein und transformieren zum vollen HGSC. Etwa 10% der LGSC erwerben eine p53-Mutation und entwickeln sich zum HGSC (J. Li, Fadare, Xiang, Kong, & Zheng, 2012).

Abbildung 5: Übersicht über verschiedene mögliche Entstehungswege des HGSC und des LGSC



TFE= Tubare Fimbrien, **BTE**= Benignes tubares Epithel, **OEI**= Ovarielle epitheliale Inklusion, **LG-SC**= Low Grade Seröses Karzinom, **HG-SC**= High Grade Seröses Karzinom, **STIC**= Seröse tubare intraepitheliale Inklusion, **SC**= seröses Karzinom, **OSE**= Ovariellies Oberflächenepithel. Modifiziert nach Li & Fadare aus dem Jahr 2012 (J. Li et al., 2012).

1.5 Molekulare Genetik

1.5.1 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressoren sind Proteine, die den Zellzyklus kontrollieren. Sie können den Zellzyklus im Falle einer DNA-Schädigung arretieren, bis die Schäden repariert wurden, etwa durch die Unterdrückung der Genexpression von Wachstumsfaktoren. Bei irreversibler Schädigung leiten sie mit der Apoptose den kontrollierten Zelltod ein. Im Falle einer Mutation eines Tumorsuppressorgens steigt das Risiko für eine maligne Entartung der Zelle. Bei Tumorsuppressorgenen geht man von der sogenannten „Two-Hit-Hypothese“ aus, laut der in beiden Allelen eine Mutation

vorliegen muss, damit ein maligne Neoplasie entsteht. Die Allele der Tumorsuppressorgene sind also rezessiv. Dies wurde erstmals beim Retinoblastomgen beschrieben (Knudson, 1971).

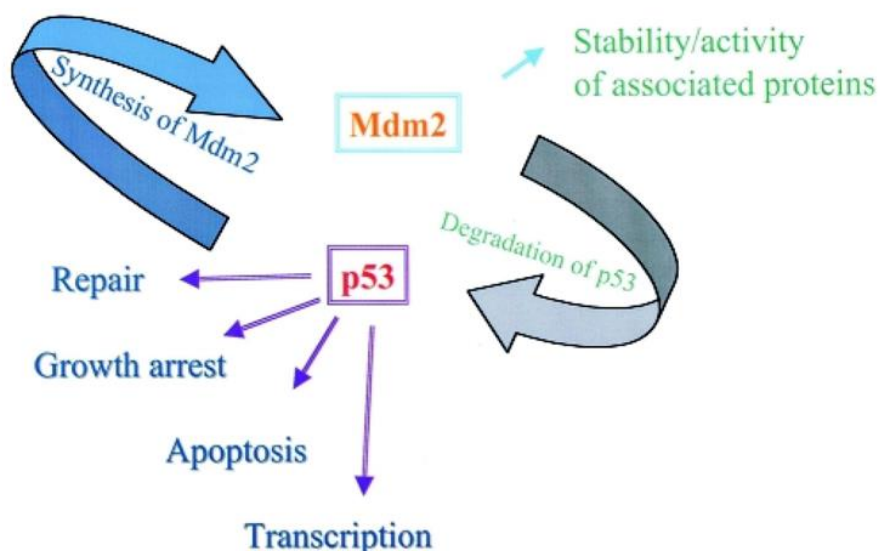
1.5.2 p53

Das Protein p53 ist ein Tumorsuppressor und das Produkt des Gens TP53. Dieses ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 53 kDa. p53 hält bei DNA-Schäden den Zellzyklus am G1/S-Übergang an. Das Protein kann zudem Reparaturproteine aktivieren. Nach erfolgreicher Reparatur wird der Zellzyklus fortgesetzt, bei irreparablen Schäden wird die Apoptose eingeleitet.

Das Schlüsselmolekül zur Regulation des p53 ist Mdm-2 (Mouse double minute 2 homolog). Es ist ein „zinc finger“-Protein, das an die Aminosäuren 22 und 23 bindet und so alle Funktionen von p53 blockiert. Dadurch kann es nicht mehr mit der Zelle interagieren (J. Chen, Lin, & Levine, 1995). Bei DNA-Schädigung trennen sich Mdm-2 und p53, sodass p53 aktiviert wird.

Es liegt ein autoregulatorischer Feedbackmechanismus vor, bei dem Mdm-2 die Aktivität von p53 reguliert und p53 die Expression von Mdm-2 (X. Wu, Bayle, Olson, & Levine, 1993).

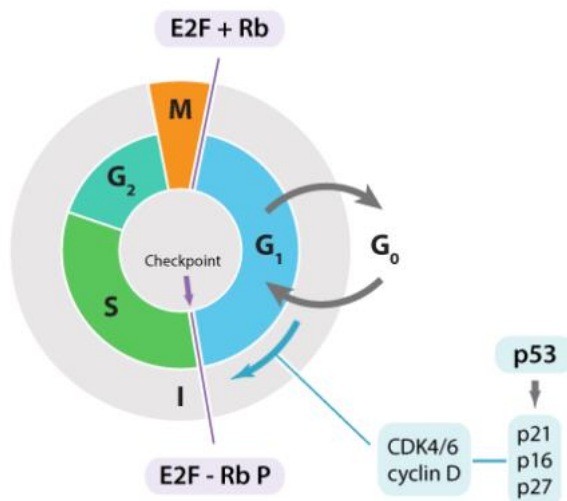
Abbildung 6: Regulation von p53 durch Mdm2 (Proctor and Gray, 2008).



p53 aktiviert über eine Signalkaskade unter anderem die Expression von WAF1/CIP1, die das Protein p21 kodieren. p21 ist ein CKI (Cyclin-dependent kinase

inhibitor), der die Komplexe CDK2, CDK1 sowie CDK 4 und 6 inhibiert, die für den Übergang von der G₁- in die S-Phase zuständig sind.

Abbildung 7: P53 und Rb und ihre Funktion im Zellzyklus (Offermanns S. and Rosenthal W., 2008).



Durch eine Loss-of-Function-Mutation im TP53-Gen fehlt dieses Stoppsignal für die Zellteilung.

P53 ist mit über 50% das am häufigsten mutierte Gen bei allen Krebsarten des Menschen, es spielt eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung (Surget, Khoury, & Bourdon, 2013), (F. Chang, Syrjanen, & Syrjanen, 1995). Beim epithelialen Ovarialkarzinom (EOC) gehört p53 ebenfalls zu den am häufigsten mutierten Genen, zusammen mit dem Rb-Gen (Hashiguchi et al., 2001) und spielt eine überaus bedeutende Rolle in der ovariellen Karzinomentstehung (Corney, Flesken-Nikitin, Choi, & Nikitin, 2008). Das Vorliegen einer p53-Mutation ist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet (Bali et al., 2004).

Hierbei besteht ein besonderer Bezug zum High Grade serösen Ovarialkarzinom, während die p53-Mutationen selten in Low Grade- oder Borderline- Tumoren zu finden sind (Kupryjanczyk et al., 1995). Ebenso fanden sich in Studien p53-Mutationen viel häufiger in schwach differenzierten oder undifferenzierten Ovarialtumoren als in gut differenzierten (Skomedal et al., 1997), (Kupryjanczyk et al., 1993). In vielen Studien wurde gezeigt, dass benigne Zystadenome und Low Grade- Ovarialkarzinome durch die fehlende p53-Mutation von den High Grade-

Karzinomen unterschieden werden können (Zheng et al., 1995), (Kmet, Cook, & Magliocco, 2003), (Kaminski, Putowski, & Oleszczuk, 2003).

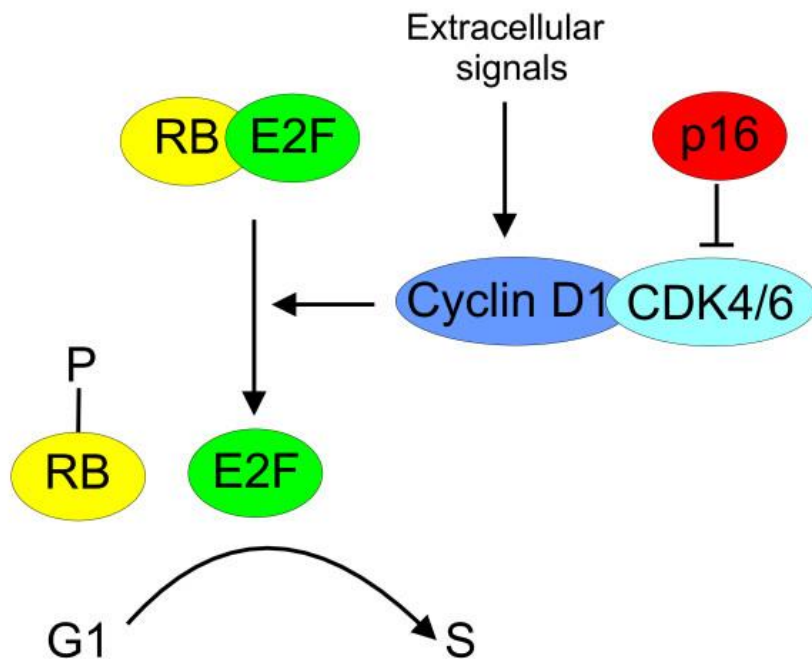
Es wurde nachgewiesen, dass p53-Mutationen sowohl die EMT (epithelial-mesenchymale Transition, d.h. die Lösung der Epithelzellen aus dem Zellverband) (C. J. Chang et al., 2011) (nachgewiesen in Mamma-Zellen) als auch die Zellmigration (nachgewiesen in Zellen der Tube, die mit der für das HGSC typischen p53-Mutation versehen wurden) entscheidend vorantreiben (Quartuccio et al., 2015).

1.5.3 p16

Das Tumorsuppressorprotein p16, auch CDK-Inhibitor 2A genannt, wird von dem Gen P16CDKN2A bzw. P16INK4A kodiert. Es fungiert als Inhibitor des CDK4/6-Komplexes. CDK4/6 bindet an Cyclin D und phosphoryliert anschließend das Retinoblastomprotein Rb. Das Tumorsuppressorprotein Rb löst sich nach der Phosphorylierung von dem Transkriptionsfaktor E2F1, der anschließend in den Zellkern eintritt und die Transkription wichtiger Gene für den G1/S-Übergang einleitet (Hara et al., 1996). Bei DNA-Schädigung oder oxidativem Stress wird p16 aktiviert, bindet an CDK4/6 und unterbricht, indem Rb in einem hypophosphorylierten Zustand gehalten wird, so den beschriebenen Signalweg. Damit wird der Zellzyklus am G1/S-Übergang arretiert. Hierbei ist die Regulation von p16 äußerst komplex (Rayess, Wang, & Srivatsan, 2012). Die Blockade des Signalwegs durch p16 begünstigt die Seneszenz der Zelle (Zellalterung). Im Rahmen der zellulären Seneszenz, die durch verschiedenen Arten von Stress und Zellschädigung ausgelöst werden kann, stellen die Zellen ihre Teilung ein und unterliegen zahlreichen morphologischen und funktionellen Veränderungen. Die zelluläre Seneszenz wird als äußerst wichtiger Faktor in der Tumorsuppression angesehen und spielt auch eine Rolle bei der Alterung des Organismus (Ben-Porath & Weinberg, 2005).

Auch für die Entstehung des epithelialen Ovarialkarzinoms spielt p16 eine wichtige Rolle (Fujita et al., 1997), (Aravidis et al., 2012). Beim High Grade- Ovarialkarzinom ist das P16INK4A-Gen weitaus häufiger mutiert als in Low Grade- Ovarialkarzinomen und Borderline-Tumoren (O'Neill et al., 2007), hierbei insbesondere in serösen und undifferenzierten Karzinomen des Ovars verglichen mit anderen histologischen Subtypen (Phillips et al., 2009). In Zystadenomen kommt eine p16-Mutation signifikant seltener vor als in malignen ovariellen Prozessen (Nazlioglu, Ercan, Bilgin, & Ozuysal, 2010).

Abbildung 8: Regulation des Zellzyklus, p16/Rb-Pathway, adaptiert nach (Peurala, Koivunen, Haapasaari, Bloigu, & Jukkola-Vuorinen, 2013).

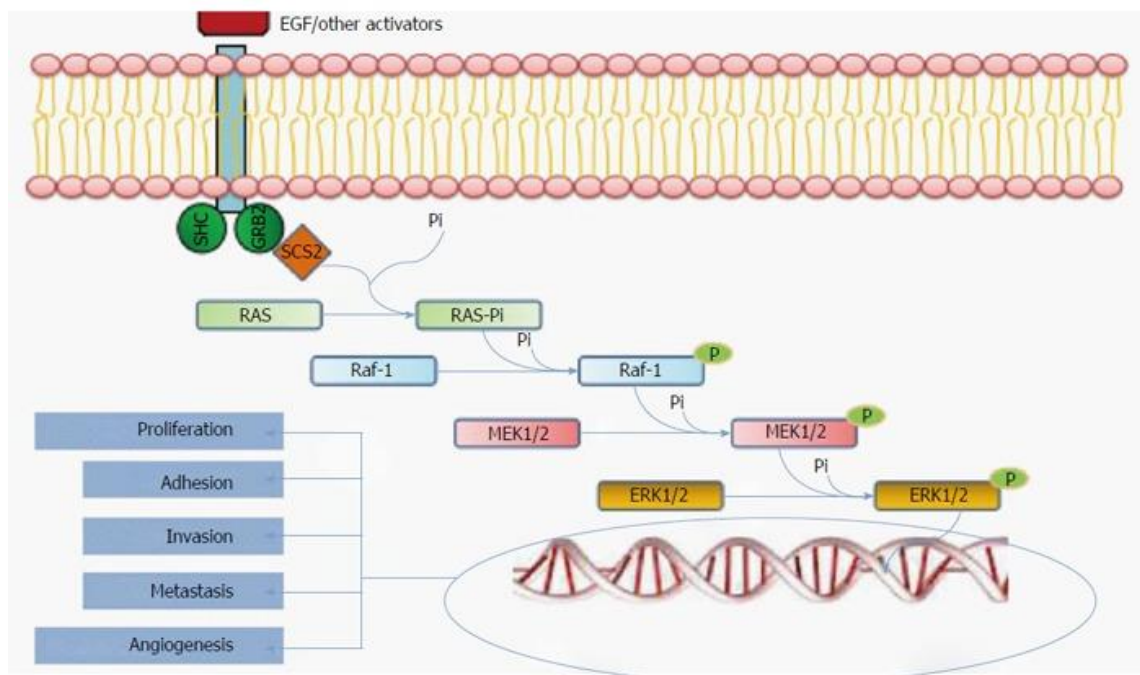


1.5.4 Onkogene

1.5.5 KRAS und BRAF

Die Protoonkogene KRAS (GTP-bindendes Protein) und BRAF (Serin/Threoninkinase) sind Teil einer Signalkaskade, die Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern leitet. Den entscheidenden Signalweg zwischen dem membranständigen Ras-Protein und dem Zellkern bildet hierbei die Kaskade über Ras-Raf-MEK-MAPK/ERK (Hilger, Scheulen, & Strumberg, 2002).

Abbildung 9: MAPK/ERK-Signalkaskade (Murcia et al., 2016).



Ein Ligand, beispielsweise ein Mitogen (Zellteilung anregende Moleküle) bzw. EGF (Extrazellulärer Wachstumsfaktor) bindet an den EGF-Rezeptor auf der Zellmembran (Boonstra et al., 1995) und ermöglicht über mehrere Zwischenschritte dem Protein Ras (rat sarcoma), sein GDP (Guanosindiphosphat) gegen ein GTP (Guanosintriphosphat) auszutauschen und somit aktiviert zu werden. Ras ist ein G-Protein, das nur in seiner aktivierten Form, also nach Bindung an ein GTP, mit weiteren Proteinen in der Signalkaskade interagieren kann. Die folgenden Proteine im Signalweg fungieren als Kinasen und aktivieren sich gegenseitig durch das Hinzufügen eines Phosphatmoleküls (Phosphorylierung). Die Proteine werden somit wie durch einen Schalter an- oder ausgeschaltet.

Das aktivierte Ras-Protein bindet nun an sein Effektorprotein, die Raf-Kinase und aktiviert sie, was durch eine Konformationsänderung möglich wird (Avruch et al., 2001), (Marshall, 1995). Durch RAF wird die Tyrosin/Threoninkinase MEK (MEK1 und MEK2) phosphoryliert. MEK kann anschließend die MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) ebenfalls durch Phosphorylierung aktivieren (früher als ERK (Extrazelluläre signalregulierte Kinase) bezeichnet).

Die MAPK wandert in den Zellkern, wo sie für die Regulation einiger für die Zellteilung wichtiger Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist, wie zum Beispiel myc und CREB. Die durch die MAPK aktivierten Transkriptionsfaktoren spielen unter

anderem auch eine Rolle in der Zelladhäsion, der Gewebeinvasion und Metastasierung von maligne entarteten Zellen, der Angiogenese sowie der Apoptose (Murcia et al., 2016), (Dhillon, Hagan, Rath, & Kolch, 2007).

Es gibt drei verschiedene RAF-Proteine, die drei Kinasen A-Raf, B-Raf und C-Raf. Alle drei Isoformen spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs (An et al., 2015).

Somatische Punktmutationen von BRAF treten in etwa 8% aller Krebsfälle des Menschen auf, am Häufigsten beim Malignen Melanom, Schilddrüsen-, Colon- und Ovarialkarzinom (Brose et al., 2002), (Davies et al., 2002). Die Mutationen ereignen sich vor allem in zwei Regionen von BRAF, in einem Glycin-reichen Loop in Exon 11 und in dem Aktivierungssegment in Exon 15 (Vakiani & Solit, 2011). Dabei ist ein Austausch von Valin durch Glutaminsäure in Codon 600 (V600E) für etwa 90% aller in menschlichen Krebszellen gefundenen Mutationen verantwortlich (Vakiani & Solit, 2011), (Davies et al., 2002).

RAS ist in etwa 15% aller Krebsfälle des Menschen mutiert (Davies et al., 2002). Hierbei findet sich eine Mutation besonders häufig beim Pankreaskarzinom, NSCLC (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom) und beim Kolonkarzinom (Bos, 1989). Am Häufigsten ereignet sich eine Mutation in Exon 2 auf Codon 12 und 13. Beim kolorektalen Karzinom machen die Mutationen in Exon 3 und 4 etwa 15% aller KRAS-Mutationen aus, während die Mutationen in Exon 2 für ca. 85% aller KRAS-Mutationen verantwortlich sind (Edkins et al., 2006), (Janakiraman et al., 2010). Beim NSCLC machen die Exon 2-Mutationen mehr als 97% aller KRAS-Mutationen aus (Forbes et al., 2006).

Aufgrund der wichtigen Bedeutung für Zellwachstum, Zellteilung und Zelltod ist die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade ein wichtiger Angriffspunkt für neue, zielgerichtete Medikamente in der Krebstherapie (Hilger et al., 2002). Beispiele hierfür sind etwa der MEK1/2 -Inhibitor Cobimetinib bei Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen soliden Tumoren (Rosen et al., 2016) oder der selektive BRAF-Inhibitor Vemurafenib beim Malignen Melanom (Ribas et al., 2014).

Auch im Ovarialkarzinom spielen KRAS- und BRAF-Mutationen eine Rolle. Zahlreiche Studien haben diese Fragestellung untersucht. In serösen Borderline-Tumoren sind KRAS-Mutationen die häufigste genetische Veränderung (Diebold, Seemuller, & Lohrs, 2003). In einer Studie aus dem Jahr 2003 wurden in 61% der serösen Borderline-Tumoren entweder eine KRAS oder eine BRAF-Mutation

gefunden (Singer et al., 2003). Auch die sogenannten Typ-I-Tumoren, das heißt low-grade Ovarialtumoren, die sich schrittweise aus Borderline-Tumoren entwickeln, sind typischerweise mit KRAS- oder BRAF-Mutationen vergesellschaftet, während in Typ-II-Tumoren, die high-grade-Neoplasien darstellen, äußerst selten KRAS- und BRAF-Mutationen zu finden sind (Shih le & Kurman, 2004), (Ayhan et al., 2009), (Vang et al., 2009).

Auch in peritonealen Implantaten wurden identische KRAS- und BRAF-Mutationen gefunden wie in den zugehörigen Borderline-Tumoren, was darauf hindeuten könnte, dass die peritonealen Implantate direkt vom ovariellen Tumor abstammen (Ardighieri et al., 2014). In rezidivierenden low-grade-Ovarialkarzinomen bei bekannter Erstdiagnose als ovarieller Borderlinetumor fand sich signifikant häufiger eine KRAS-Mutation als eine BRAF-Mutation. Dies ließ die Autoren darauf schließen, dass vor allem KRAS eine ursächliche Rolle in diesen Tumoren spielt, wenngleich auch nicht in allen untersuchten Tumoren eine KRAS-Mutation gefunden wurde (Tsang et al., 2013).

KRAS-Mutationen kommen in vielen histologischen Subtypen des invasiven Ovarialkarzinoms vor, mit 50% am Häufigsten im muzinösen Typ. Es fanden sich in einer Studie aus dem Jahr 2003 keine BRAF-Mutationen in muzinösen ovariellen Tumoren (Gemignani et al., 2003). Es finden sich auch häufig Mutationen von KRAS oder BRAF in serösen Borderline-Tumoren, während sie in serösen invasiven Karzinomen nicht zu finden sind. In invasiven Ovarialtumoren anderer histologischer Subtypen sind diese Mutationen eher selten (Mayr et al., 2006).

1.5.6 Familiäres Ovarialkarzinom

1.5.7 BRCA1/ BRCA2 und Rad51c

BRCA1 und BRCA2 (Breast Cancer Gen 1 und 2) sind Tumorsuppressorgene, die für Proteine gleichen Namens kodieren. Sie werden vor allem in Brustdrüsengewebe, aber auch in anderen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert (Hedau et al., 2015), (Bernard-Gallon et al., 2001). Als sogenannte „caretaker genes“ tragen sie zur Stabilisierung des Genoms bei. Das BRCA1-Protein wird bei chromosomalen Schäden aktiviert. Unter anderem spielt BRCA1 eine Rolle in der Mismatch Repair. Die Mismatch Repair ist ein Teil der DNA-Reparatur. Die betreffenden Proteine erkennen eine Fehlpaarung im DNA-Doppelstrang, die dann von einer speziellen

Nuklease herausgeschnitten wird (Fukui, 2010).

Außerdem sind BRCA1 und BRCA2 an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt (Welcsh & King, 2001). Auch die Regulation der Transkription wird durch BRCA1 und BRCA2 beeinflusst (Friedenson, 2007). Die Reparatur der Doppelstrangbrüche erfolgt über die homologe Rekombination, das heißt es wird die identische homologe Sequenz von einem Schwesterchromatid oder vom selben Chromosom als Vorlage verwendet. Die beiden homologen Chromosomenabschnitte werden nebeneinander positioniert und dann gegeneinander ausgetauscht. Hierbei bindet der Tumorsuppressor PALB2 an BRCA1 und BRCA2 und verbindet diese. Gemeinsam binden sie an den Tumorsuppressor RAD51 (Prakash, Zhang, Feng, & Jasin, 2015), (Buisson et al., 2010). Der entscheidende Schritt des Austausches der homologen DNA-Abschnitte wird durch RAD51 vermittelt (Holthausen, Wyman, & Kanaar, 2010), (Arnaudeau, Helleday, & Jenssen, 1999).

Keimbahnmutationen von BRCA1 sind assoziiert mit dem HGSC (Schrader et al., 2012) und kommen in über 50% der HGSC-Fälle vor (McMillen et al., 2012).

Wenn eine Mutation vorliegt, kann die geschädigte DNA nicht mehr repariert werden. Dies erhöht das Risiko für eine maligne Entartung (Friedenson, 2007). Es gibt verschiedenste komplexe Möglichkeiten der Mutation. Häufig sind es Punktmutationen oder Insertionen beziehungsweise Deletionen. Es kann sich jedoch auch um langstreckige Umlagerungen in den BRCA-Genen handeln, die viele Basenpaare umfassen können (Mazoyer, 2005).

Frauen mit einer BRCA1- Mutation haben gemäß einer Metaanalyse verschiedener Fallstudien aus dem Jahr 2003 im Alter von 70 Jahren ein Mammakarzinom-Risiko von 65% und ein Ovarialkarzinom-Risiko von 39%. Im Falle einer BRCA2-Mutation lag das Risiko im Alter von 79 Jahren bei 45% beziehungsweise 11% (Antoniou et al., 2003). Das Risiko erhöht sich mit steigendem Alter fortwährend. Im Alter von 80 Jahren besteht bei einer BRCA1-Mutation bereits ein rund 80%iges Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms und ein 55%iges Risiko für das Ovarialkarzinom (Ford et al., 1998), (Easton, Ford, & Bishop, 1995; King, Marks, & Mandell, 2003). Aufgrund des stark erhöhten Karzinomrisikos wird bei Nachweis einer BRCA1/2-Mutation häufig eine prophylaktische operative Therapie empfohlen. Hierzu wurden deutschlandweit universitäre Zentren für familiären Brust- und Eierstockkrebs eingerichtet, die diese Operationen nach klaren Richtlinien

durchführen. Vor einer möglichen Operation erfolgt eine Risikokalkulation mithilfe des betroffenen Gens, des Alters der Patientin und der Prognose nach Ersterkrankung. Die Operation wird um das 40. Lebensjahr empfohlen, wobei die Familienplanung nach Möglichkeit abgeschlossen sein sollte (Graeser et al., 2009; Kauff et al., 2008). Die prophylaktische chirurgische Mastektomie konnte das Risiko in einer Studie aus dem Jahr 2010 erheblich reduzieren. Es wurde bei 254 Frauen der Verlauf nach Mastektomie untersucht. Durchschnittlich betrug das Karzinomrisiko 0,2% pro Frau pro Jahr (Kaas et al., 2010). Auch bei der prophylaktischen beidseitigen Salpingo-Oophorektomie kann eine erhebliche Risikoreduktion erreicht werden (Olopade & Artioli, 2004), (Foulkes, 2013), (Evans, Clayton, Donnai, Shenton, & Lalloo, 2009).

1.5.8 Andere beteiligte Gene beim familiären Ovarialkarzinom

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Gene identifiziert, die für eine familiäre Häufung mitverantwortlich sein könnten. Das Protein RAD51c spielt eine wichtige Rolle in der Doppelstrangbruchreparatur. Diese wird durch homologe Rekombination erreicht, wobei RAD51c den entscheidenden Austauschschritt der homologen DNA-Abschnitte vermittelt. In einer Studie aus dem Jahr 2013 wurden 117 Index-Fälle mit familiärer Häufung von Brust- und Eierstockkrebs, die einen negativen BRCA-Status hatten, analysiert. Dabei wurden 3 Mutationen in RAD51c gefunden, was einer Rate von 2,6% entspricht. Die Autoren schließen daraus, dass RAD51c an der Genese des familiären Brust- und Eierstockkrebs beteiligt ist und empfehlen, es zusammen mit BRCA in das Screening mit einzubeziehen (Coulet et al., 2013). Weitere relevante Genen sind das TP53, etwa beim Li-Fraumeni-Syndrom, außerdem weitere Genen die an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind, wie CHEK2, RAD51, BRIP1 und PALB2. Die aktuellsten Entwicklungen in der Gensequenzierung, das sogenannte Next-Generation-Sequencing, erlaubt die simultane Untersuchung vieler Gene, die für die Entstehung infrage kommen. Diese Untersuchungen könnten bei gesunden Frauen zu einem personalisierten Krebsrisiko-Management mit klinischer und radiologischer Überwachung sowie chemotherapeutischer und chirurgischer Prophylaxe führen. Auch für Krebspatientinnen könnte die Identifikation von Zielgenen wichtige Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien liefern (Toss et al., 2015).

1.6 Klinik

1.6.1 Symptome

Patientinnen mit Ovarialkarzinom entwickeln meist keine speziellen Symptome. Wenn Symptome auftreten, dann erst in fortgeschrittenen Stadien und zumeist unspezifisch. Mögliche Symptome sind gastrointestinale Beschwerden, Stuhlveränderungen, Leistungsknick oder genitale Blutungen. Es kann weiterhin zu Gewichtsabnahme kommen sowie zu einer Zunahme des Bauchumfangs, die durch die teils massive Bildung von malignem Aszites entstehen kann. Häufig ist die Bauchumfangszunahme der Anlass zum Besuch des Hausarztes, hierbei handelt es sich jedoch bereits um ein Spätstadium. Noch später kann es zu Tumorkachexie und „Facies ovarica“ (eingefallenes Gesicht) kommen. Ebenfalls kann es zu Pleuraergüssen kommen.

1.6.2 Diagnostik

70% der ovariellen Karzinome werden erst im Stadium FIGO IIB-IV (s. Kapitel 1.6.3) diagnostiziert. Bei Verdacht auf ein Ovarialkarzinom besitzt das operative Staging den höchsten Stellenwert und erlaubt die genaueste Einschätzung der Operabilität (Salani, Axtell, Gerardi, Holschneider, & Bristow, 2008). Zusätzlich kann eine Schnittbildgebung (CT oder MRT) zum Staging eingesetzt werden.

Bis heute existieren keine etablierten Früherkennungsmethoden. Im Folgenden werden einige häufig im Rahmen der Diagnosestellung des Ovarialkarzinoms durchgeführte Maßnahmen beschrieben, die jedoch alle wenig Evidenz und Nutzen aufweisen.

Bei Verdacht auf ein Ovarialkarzinom häufig durchgeführte Untersuchungen sind die Transvaginalsonographie und die Bestimmung des CA 125-Spiegels im Serum. In einer randomisierten kontrollierten Studie wurden hierzu im Zeitraum von 1993 bis 2001 mehr als 78 000 Frauen im Alter von 55 Jahren bis 74 Jahren in den USA entweder einer jährlichen Vorsorgeuntersuchung mit beiden genannten Methoden unterzogen oder sie erhielten die normale Versorgung ohne Screening. Die Studie kommt zu dem Schluss, dass die Vorsorgeuntersuchung sowohl mit transvaginalen Ultraschall als auch mit Bestimmung des CA 125-Serumspiegels zu keiner Reduktion

der Mortalität führten. Zudem wurde eine erhebliche Anzahl an falsch-positiven Befunden erhoben. Die daraufhin durchgeführten konservativen und chirurgischen Folgeuntersuchungen waren zu 15% mit Komplikationen verbunden (Buys et al., 2011). Diese Ergebnisse wurden in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2013 bestätigt (Reade, Riva, Busse, Goldsmith, & Elit, 2013).

Außer den beiden oben genannten Methoden wird immer eine vollständige gynäkologische Untersuchung durchgeführt, die jedoch in der Regel nur wenig zur Diagnosefindung beitragen kann.

Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht in der Messung sogenannter zirkulierender Tumorzellen (CTCs). Aktuelle Studien zeigen, dass die hämatogene Streuung von Tumorzellen beim epithelialen Ovarialkarzinom eine wichtige Rolle spielt und dass die CTCs mit einem erhöhten Tumorgrad, einem erhöhten CA-125-Wert und auch mit dem Grad eines Residuums nach Operation assoziiert sind (Van Berckelaer et al., 2016).

1.6.3 Krankheitsstadien (TNM, FIGO)

Klinisch wird die FIGO-Klassifikation herangezogen. Sie ist ein international anerkanntes System zur Einteilung des Ovarialkarzinoms, die von der „Internationalen Vereinigung für Gynäkologie und Geburtskunde“ herausgegeben wird. Die FIGO beruht auf einem klinischen Staging. Die TNM-Klassifikation wird seit 1950 von der UICC (International Union against cancer) herausgegeben und erlaubt eine Stadieneinteilung gemäß pathologischer oder chirurgischer Kriterien (s. Tabelle unten). Dabei steht T für die Ausdehnung des Primärtumors, N für das Vorhandensein oder Fehlen regionaler Lymphknotenmetastasen und M für das Vorhandensein oder Fehlen hämatogener Fernmetastasen. Die Bestimmung der Fernmetastasen ist nur nach einem Staging möglich.

Hierfür können verschiedene Methoden zum Einsatz kommen wie die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie oder andere bildgebende Verfahren.

Im Folgenden wird das Staging des Ovarialkarzinoms gemäß FIGO-Klassifikation und TNM-Klassifikation aufgeführt nach (Prat, 2014), (Edge & Compton, 2010), (NCCN, 2015).

Tabelle 1: TNM-Einteilung und FIGO-Klassifikation

TNM	FIGO	
TX		Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0		Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	I	Tumor auf die Ovarien beschränkt
T1a	I A	auf ein Ovar beschränkt, Kapsel intakt, Ovarialoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	I B	Befall beider Ovarien, ansonsten wie Stadium IA
T1c	I C	Tumor befällt ein Ovar oder beide Ovarien
	I C1	iatrogene Kapselruptur
	I C2	präoperative Kapselruptur oder Tumor auf der Ovarialoberfläche
	I C3	maligne Zellen im Aszites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	II A	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben
T2b	II B	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens
T3	III	Tumor auf einem oder beiden Ovarien mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetast.
T3	III A	retroperitoneale Lymphknotenmetastasen und/oder mikroskopische Metastasen außerhalb des kleinen Beckens
T3a	III A1	ausschließlich retroperitoneale Lymphknotenmetastasen

	III A1 i ii	Metastasen ≤ 10 mm Metastasen > 10 mm
	III A2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b	III B	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; einschließlich Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz
T3c	III C	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und die Milz ein
M0		Keine Fernmetastasen
M1	IV	Fernmetastasen (mit Ausnahme peritonealer Metastasen)
	IV A	Pleuraerguss mit positiver Zytologie
	IV B	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen zu außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)
NX		Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0		Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	IIIC	Regionale Lymphknotenmetastasen

1.6.3 Therapie

Die Therapie des Ovarialkarzinoms besteht grundsätzlich aus einer Operation und einer stadiengerechten adjuvanten Chemotherapie.

Operative Therapie

Bei dringendem Verdacht auf ein Ovarialkarzinom wird möglichst umgehend mit der Therapie in einem spezialisierten Zentrum begonnen. Die mit Abstand wichtigste Säule hierbei ist die operative Therapie. Die Art der Therapie hängt entscheidend vom Tumorstadium und dem Ergebnis des intraoperativen Schnellschnitts ab. Liegt bei einem Tumor im Ovar ein karzinomnegativer Schnellschnitt vor, wird der Tumor ausgeschält und eventuell die Adnexe unter „No-touch“-Technik entfernt, da auch gutartige Tumoren in das Peritoneum streuen könnten. Bei karzinompositivem Schnellschnitt wird eine radikale Staging-OP mit Längsschnittlaparotomie angestrebt. Die Prognose ist direkt abhängig von der Radikalität der Operation, so dass neben den inneren Geschlechtsorganen auch das Omentum majus, die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten sowie weitere makroskopisch befallene Stellen, etwa Teile des Peritoneums oder der Appendix entfernt werden. (S. J. Chang & Bristow, 2015). Dies bezieht sich auf die Standard-Prozedur. Es muss jedoch immer auf die individuelle Situation der Patientin geachtet werden. So muss beispielsweise bei sehr jungen Patientinnen abgewägt werden, ob auch eine weniger radikale Operation vertretbar wäre.

Ein Sonderfall liegt beim Borderline-Tumor vor. Auf eine Lymphknotenentfernung kann hier verzichtet werden, zudem kann bei Kinderwunsch organerhaltend operiert werden, sofern das kontralaterale Ovar oder das Rest-Ovar tumorfrei sind. Hierbei wird lediglich das betroffene Ovar mit zugehöriger Tube entfernt. Dies trifft für Frauen unter 40 Jahren zu bei gesichertem Stadium FIGO IA sowie einem Grading von G1. Zusätzlich werden hier immer Proben aus dem Bauchraum, der kontralateralen Adnexe und eventuell anderen Stellen entnommen, um Implantate auszuschließen. Diese Operation kann die Fruchtbarkeit jedoch aufgrund des Parenchymverlusts im Ovar und durch Adhäsionen einschränken (Fischerova, Zikan, Dundr, & Cibula, 2012), (Trope, Kaern, & Davidson, 2012).

Medikamentöse Therapie

Außer im Stadium FIGO 1A und Grading G1 wird als First-Line-Therapie grundsätzlich eine adjuvante Chemotherapie mit Carboplatin und einem

Mitosehemmstoff (z.B. einem Taxan wie Paclitaxel) durchgeführt. Hierbei werden alle histologischen Subtypen der Ovarialkarzinome in der Regel gleichbehandelt.

Rezidivtherapie

Auch in der Rezidivtherapie ist ein operatives Vorgehen anzustreben. Dies gilt insbesondere bei einem positiven AGO-Score (Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie). Dieser gilt als positiv bei gutem Allgemeinzustand, kompletter Tumorresektion bei Erst-OP sowie dem Vorhandensein von weniger als 500 ml Aszites. In entsprechend andersgelagerten Fällen ist er als negativ zu werten. Der AGO-Score hat sich als nützlicher Vorhersagewert für den Erfolg einer zweiten zytoreduktiven Operation bei Erstrezidiv erwiesen (Muallem et al., 2015).

Medikamentös kommt als Second-Line-Therapie bei platin-resistentem Rezidiv eine alternative Monotherapie mit Topotecan, Paclitaxel, liposomalem Doxorubicin oder Gemcitabin in Frage. Im Falle eines Platin-sensiblen Rezidivs kann eine Kombinationstherapie aus Carboplatin und Paclitaxel oder Doxorubicin versucht werden. Alle Schemata können mit dem Angiogenesehemmer (VEGF-Inhibitor) Bevacizumab kombiniert werden. Bevacizumab ist seit 2011 zugelassen für die Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms im Stadium FIGO IIIB-IV. Das progressionsfreie Überleben konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe um 4 Monate verlängert werden (Burger et al., 2011).

Die medikamentöse Therapie erfolgt stets angepasst an das Tumorstadium.

Hormonelle Therapie

Möglich ist ebenfalls die ergänzende Hormontherapie zur Verbesserung der Lebensqualität durch Symptome des Östrogenmangels mit GnRH-Analoga, Tamoxifen oder Gestagenen. Aufgrund nicht eindeutiger und teils widersprüchlicher Angaben in der Literatur gibt es auch in der aktuellen S3-Leitlinie keine klare Empfehlung für eine hormonelle Therapie bei Zustand nach Ovarialkarzinom. Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Hormontherapie bei Patienten mit positiven Östrogenrezeptoren in der Zukunft durchaus eine sinnvolle Option darstellen könnte (Yokoyama & Mizunuma, 2013).

Zielgerichtete Therapie: PARP-Inhibitoren

Der PARP-Inhibitor Olaparib blockiert das Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), das neben verschiedenen Aufgaben in der Zelle wie genomische Stabilität, Apoptose, Inflammation und Telomer-Erhalt auch an der DNA-Reparatur und an der Unterdrückung der Tumorgenese beteiligt ist (Piskunova et al., 2008). In diesem

Zusammenhang wurden in den letzten Jahren Untersuchungen zum Nutzen für Ovarialkarzinom-Patientinnen durchgeführt. In einer retrospektiven Analyse einer randomisierten Phase-II-Studie wurden 265 Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit Platin-sensitivem Rezidiv auf Olaparib oder Placebo randomisiert.

Das progressionsfreie Überleben (PFS) konnte jedoch nur bei BRCA-positivem Status signifikant gesenkt werden, von 4,3 auf 11,2 Monate. Bei Patientinnen ohne BRCA-Mutation wurde die PFS nur nicht signifikant von 5,5 auf 7,4 Monate verlängert (Ledermann et al., 2014). Dies beruht darauf, dass bei einer Mutation des BRCA-Gens, das ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt ist, die Zell-Proliferation stärker als bei gesunden Zellen von dem Protein PARP abhängt und aufrechterhalten werden kann. Dies macht die Zelle anfällig für eine selektive Inhibition. Durch den Inhibitor Olaparib wird so der Zelltod eingeleitet. Die Zellen, bei denen BRCA intakt ist, sind davon nicht betroffen (Meehan & Chen, 2016). Im Dezember 2014 wurde mit der Zulassung von Olaparib (Lynparza™) zum ersten Mal eine zielgerichtete Therapie für die genannte spezielle Untergruppe des malignen Ovarialkarzinoms von der Europäischen Kommission und der europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen. Dieses Thema wurde seitdem in zahlreichen Studien aufgegriffen und die Ergebnisse bestätigt (Bixel & Hays, 2015), (Bornstein & Jimeno, 2016), (Chase, Patel, & Shields, 2016), (Frampton, 2015), (Matulonis et al., 2016), (Oza et al., 2015).

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie spielt bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms eine untergeordnete Rolle, zum einen wegen der intraperitonealen Lage, zum anderen wegen geringer Strahlensensibilität. Einen erfolgsversprechenden Ansatz liefert jedoch die intensitätsmodulierte Bestrahlung, bei der die Strahlendosis durch Aufteilung der Bestrahlungsfelder in kleine Areale erheblich verringert werden kann. Die Strahlentherapie ist nur in einer Palliativsituation indiziert, beispielsweise zur Linderung der Schmerzen bei Knochenmetastasen (S. W. Lee et al., 2011).

Nachsorge, Rehabilitation

In der Nachsorge steht die Erhaltung der Lebensqualität der Patientinnen im Vordergrund. Schwerpunkte bilden die Minimierung der Nebenwirkungen der Therapie, das Wahrnehmen von Rehabilitationsmaßnahmen und die engmaschige psychosoziale Betreuung.

Prävention bei familiärem Ovarialkarzinom

Bei jungen Frauen mit Nachweis einer Mutation im BRCA1- oder BRCA2- Gen oder hohem familiären Risiko (mehrere Verwandte 1. Grades mit Mamma-oder Ovarialkarzinom oder Verwandte mit besonders frühem Erkrankungsalter) werden intensivierete Früherkennungsmethoden empfohlen, weiterhin kann eine präventive Mastektomie bzw. Adnexektomie ab dem 40. Lebensjahr bei abgeschlossener Familienplanung erwogen werden (Schlehe & Schmutzler, 2008). Dabei müssen stets die Nebenwirkungen und Risiken abgewogen werden.

1.6.4 Prognose:

Die Prognose und die mittlere Überlebenszeit hängen stark von FIGO-Stadium und TNM-Status zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Tumors ab. In den Stadien FIGO IIB – IV, die zu 70% bei Erstdiagnose vorliegen, liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei deutlich unter 40%, während sie im Stadium FIGO I-IIA bei ca. 80% liegt (Creasman et al., 2006).

Tabelle 2: Überlebensraten je nach FIGO-Stadium

Stadium	5-Jahres-Überlebensrate
FIGO I	80%
FIGO II	60%
FIGO III	23%
FIGO IV	14%

Dabei spielen das Alter, der Allgemeinzustand und vor allem der postoperative Residualtumor eine wichtige Rolle.

Während ca. 23% aller gynäkologischen Tumoren ovariellen Ursprungs sind, werden die Todesfälle durch Krebs des weiblichen Genitaltrakts zu 47% vom Ovarialkarzinom verursacht (Denny, Quinn, & Hacker, 2012). Muzinöse Tumoren sprechen schlechter auf eine platinhaltige Chemotherapie an und sowohl das Rezidivrisiko als auch die Mortalität sind deutlich höher als beim serösen und endometrioiden Ovarialkarzinom (du Bois et al., 2009).

Die starke Abhängigkeit des Überlebens vom Tumorstadium bei Erstdiagnose und die hohe Zahl an Todesfällen durch das Ovarialkarzinom belegt die große

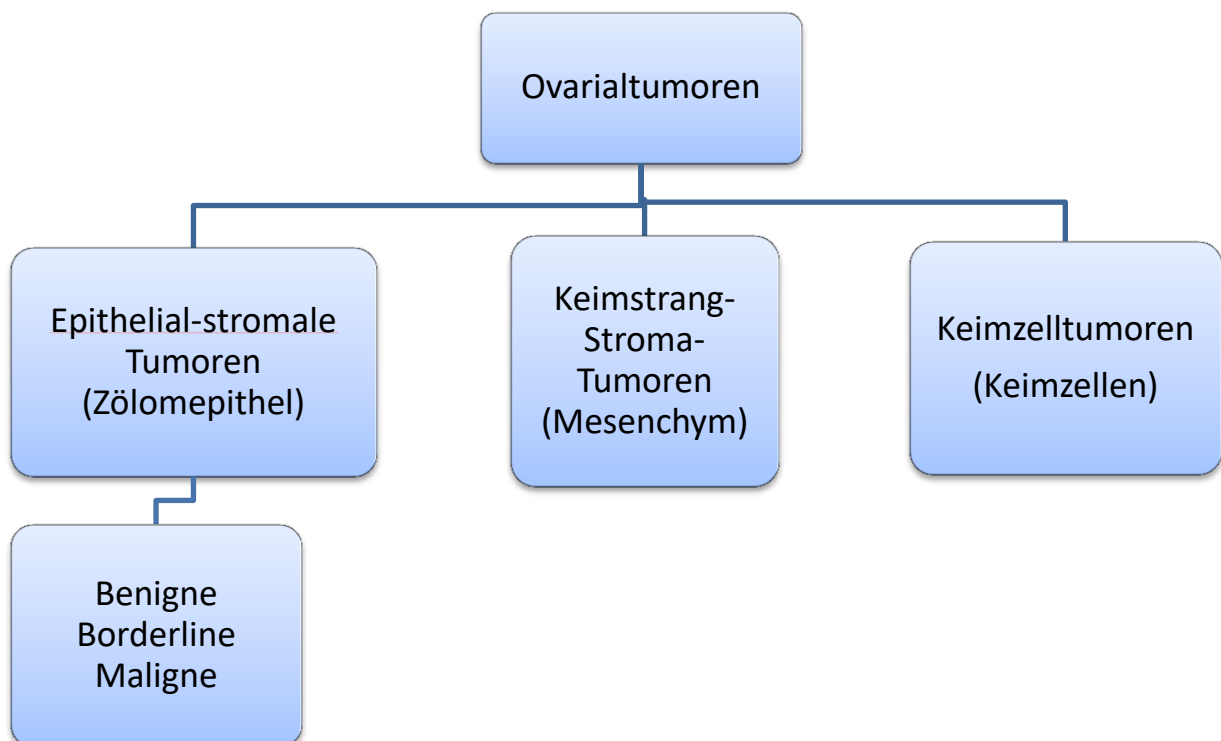
Bedeutung, die der Etablierung wirkungsvoller Früherkennungsmethoden zukommt.

1.7 Histologische Klassifikation

Die ovariellen Tumoren entwickeln sich histologisch aus verschiedenen Ursprungsgeweben und werden daher in verschiedene Gruppen unterteilt. Im Jahr 1973 wurde von Serov und Scully eine systematische Klassifikation im Namen der WHO erstellt, die bis heute Gültigkeit besitzt (Serov & Scully et al., 1973).

Es gibt drei große histologische Gruppen. Die mit rund 60 bis 70% häufigste Gruppe bilden die vom Zölomepithel abstammenden epithelial-stromalen Tumoren. Hier wird zudem in allen Subtypen unterschieden zwischen malignen, benignen und Borderline-Tumoren, die histomorphologisch eine Zwischenform zwischen malignen und benignen Tumoren einnehmen. Es existieren zwei weitere Gruppen, die Keimstrang-Stroma-Tumoren, die mesenchymaler Herkunft sind und die Keimzelltumoren.

Abbildung 10: Übersicht über die histologische Herkunft der Ovarialtumoren



Die epithelialen Tumoren werden weiter aufgeteilt in die serösen, muzinösen, endometrioiden, klarzelligen, Transitionalzell- (=Brenner-Tumoren), squamösen,

gemischt-epithelialen und undifferenzierten Tumoren. Hierbei sind das seröse, endometrioiden und klarzellige die häufigsten Entitäten (Diebold, 1998).

Das seröse Karzinom wird meistens in den Stadien III oder IV entdeckt, in denen bereits eine Streuung stattgefunden hat. Demgegenüber werden die klarzelligen und endometrioiden Tumoren, die mit der atypischen Endometriose assoziiert sind, häufig im Stadium I entdeckt und neigen tendenziell eher zu lokalem Wachstum (Kaku et al., 2003).

Es wird heute angenommen, dass der Großteil der ehemals als High Grade klassifizierten endometrioiden Karzinome in Wahrheit vom serösen Typ ist. In diesem Zusammenhang wird die Genexpression des Tumorsuppressorgens WT1 als hilfreicher Marker angesehen, da dieses Protein als relativ spezifisch für das seröse Ovarialkarzinom gilt (McCluggage, 2011).

Die Keimstrang-Stroma-Tumoren umfassen die Granulosazell-, Sertolizell- und Steroidzelltumoren sowie die Tumoren vom gemischten oder unklassifizierten Typ. Die Keimzelltumoren schließlich werden unterteilt in Teratome, Dottersacktumoren, das Dysgerminom und das Chorionkarzinom.

Übersicht epithelialer benigner, maligner und Borderline-Ovarialtumoren gemäß "WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs 2014" (Kurman & Carcangiu ML, 2014)

1) Seröse Tumoren

Benigne:

- Seröses Zystadenom
- Seröses Adenofibrom
- Seröses Oberflächenpapillom

Borderline:

- Seröser Borderline-Tumor / Atypischer proliferativer seröser Tumor
- Seröser Borderline-Tumor - Mikropapilläre Variante / Nicht-invasives Low Grade seröses Karzinom

Maligne:

- Low Grade seröses Karzinom
- High Grade seröses Karzinom

2) Muzinöse Tumoren

Benigne:

- Muzinöses Zystadenom
- Muzinöses Adenofibrom

Borderline:

- Muzinöser Borderline-Tumor / Atypischer proliferativer muzinöser Tumor

Maligne:

- Muzinöses Karzinom

3) Endometrioide Tumoren

Benigne:

- Endometrioide Zyste
- Endometrioides Zystadenom
- Endometrioides Adenofibrom

Borderline:

- Endometrioider Borderline-Tumor / Atypischer proliferativer endometrioider Tumor

Maligne:

- Endometrioides Karzinom

4) Klarzellige Tumoren

Benigne:

- Klarzelliges Zystadenom
- Klarzelliges Adenofibrom

Borderline:

- Klarzelliger Borderline-Tumor / Atypischer proliferativer klarzelliger Tumor

Maligne:

- Klarzelliges Karzinom

5) Brenner-Tumoren

Benigne:

- Brenner-Tumor

Borderline:

- Borderline Brenner-Tumor / Atypischer proliferativer Brenner-Tumor

Maligne:

- Maligner Brenner-Tumor

6) Seromuzinöse Tumoren

Benigne:

- Seromuzinöses Zystadenom
- Seromuzinöses Adenofibrom

Borderline:

- Seromuzinöser Borderline-Tumor / Atypischer proliferativer seromuzinöser Tumor

Maligne:

- Seromuzinöses Karzinom

7) Undifferenziertes Karzinom

2 Zielsetzung und Fragestellung

Die Ovarialkarzinome haben eine äußerst schlechte Prognose. In den letzten Jahren und Jahrzehnten waren alle Bemühungen um effektivere Therapien weitgehend vergebens. Noch immer hängt die Prognose entscheidend vom Tumorstadium bei Ersterkrankung sowie dem Erfolg der Operation ab. Effektive medikamentöse Therapien gibt es kaum. Für alle Arten des Ovarialkarzinoms wird dieselbe Chemotherapie verwendet. Diese Chemotherapie spricht bei Low Grade- und High Grade- Karzinome unterschiedlich gut an und hat insgesamt nur eine eingeschränkte Wirksamkeit. Die Prognose kann dadurch nicht entscheidend verbessert werden. Vor diesem Hintergrund wird die große Bedeutung eines genaueren Verständnisses der molekulargenetischen Entstehungswege der Ovarialkarzinome deutlich. Die daraus resultierende Tumoreinteilung ist entscheidend für die richtige Diagnostik, für die Therapie und die daraus resultierende Prognose. Nur so können spezialisierte, gezielte Therapien entwickelt werden, die für jedes Karzinom eine maximale Wirksamkeit entfalten.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Theorie der dualen Tumorgenese zu überprüfen. Hierzu sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Gibt es unter den serösen High Grade- Karzinomen wie zu erwarten eine hohe Zahl an Mutationen in TP53?

2. Gibt es wie zu erwarten keine KRAS und BRAF-Mutationen in den High Grade- Karzinomen?
3. Gibt es eine hohe Zahl an TP16-Mutationen?
4. Wie verhalten sich TP16- und TP53-Mutationen zueinander?
5. Wie verhalten sich etwaige KRAS- oder BRAF-mutierte Fälle zum Rest des Kollektivs? Welche Zusammenhänge und Unterschiede gibt es?
6. Gibt es Fälle, die nicht mit der Theorie der dualen Tumorgenese erklärbar sind? Wenn ja, wie lassen sich diese Fälle gegebenenfalls einordnen?
7. Lässt sich abschließend die Theorie der dualen Tumorgenese bestätigen oder muss sie gegebenenfalls erweitert werden?

3 Material und Methoden

Die vier Gene TP53, TP16, KRAS und BRAF sollen auf Mutationen untersucht werden. Bei den beiden Tumorsuppressorgenen TP53 und TP16 geschieht dies mittels Immunhistochemie. Für KRAS und BRAF kommt die Methode der Pyrosequenzierung zum Einsatz. Es wird in Paraffin konserviertes Tumormaterial aus dem Archiv verwendet. Für die Immunhistochemie werden Schnitte mit einem Farbstoff-gekoppelten Antikörper behandelt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Für die Pyrosequenzierung werden ungefärbte Leerschnitte hergestellt. Von diesen Leerschnitten wird Zellmaterial gewonnen, aus dem dann gereinigte DNA-Moleküle für die Pyrosequenzierung isoliert werden.

3.1 Patientenkollektiv

Bei dem Patientenkollektiv handelt es sich um Patientinnen im Alter zwischen 10 und 87 Jahren und einem Durchschnittsalter von 61,5 Jahren. Die Patientinnen wurden zwischen 1981 und 2003 im Klinikum Großhadern betreut. Sie alle erhielten eine primär chirurgische Behandlung sowie stadienabhängig zusätzlich eine Strahlen- oder Chemotherapie (Hartmann & Mayr et al., 2015)

3.1.1 FFPE-Material

Die in Paraffinblöcken gelagerten Gewebeproben wurden aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der LMU München ausgewählt. Die Gewebeproben wurden

als FFPE-Material (Formalin-fixed paraffin-embedded tissue) aufbewahrt. Anhand des zu jedem Block bereits vorhandenen HE-Schnitts wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob sich auf dem Block auch wirklich Tumormaterial des Ovars befand. Fälle ohne Tumormaterial wurden aussortiert. Durch diese Überprüfung ergab sich ein Kollektiv mit serösen High-Grade-Ovariakarzinomen (HGSC) von 152 Patientinnen.

3.1.2 Leerschnitte

Es wurden von jeder Gewebeprobe acht Leerschnitte hergestellt. Die Erstellung dieser Schnitte für die Lichtmikroskopie erfolgte an einem handelsüblichen Rotationsmikrotom. Als Schneidwerkzeug kam ein Stahlmesser zum Einsatz. Hierzu wurden die Blöcke einige Minuten auf eine -20°C kalte Platte gelegt und dann im Mikrotom eingespannt. Der Schneidewinkel wurde so eingestellt, dass die ganze Fläche des Paraffinblocks vom Messer erfasst wurde. Es wurden Schnitte der Dicke 2µm hergestellt und kurz in ein Wasserbad gegeben. Anschließend wurden sie auf einen gläsernen Objektträger aufgezogen und bei 60°C für 12 Minuten angetrocknet. Von den acht Leerschnitten wurde je ein Schnitt für das Protein p53 und einer für das Protein p16 immunhistochemisch gefärbt (Antikörper mit gekoppeltem Farbstoff). Ein weiterer Leerschnitt wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Die übrigen fünf Leerschnitte wurden zur Gewinnung von Tumormaterial für die Pyrosequenzierung verwendet.

3.2 Immunhistochemie (IHC) für p53 und p16

Bei der Immunhistochemischen Färbung wird ein bestimmtes Protein angefärbt. Hierzu wird ein künstlich hergestellter Antikörper mit einem gekoppelten Farbstoff verwendet, der spezifisch an das gewünschte Protein bindet. Anhand der Stärke der Protein-Expression lässt sich im Falle von p53 und p16 eine Aussage über das Vorhandensein einer Mutation des zugehörigen Gens treffen. Beide Reaktionen erfolgten vollautomatisch am Ventana.

Abbildung 11: HGSC p53-starke IHC- Anfärbung
IRS=12



Abbildung 12: HGSC p16–starke IHC-Anfärbung:
IRS=12



Abbildung 13: HGSC p53- keine IHC-Anfärbung IRS= 0



Abbildung 14: HGSC p16 - keine IHC-Anfärbung IRS=0



Es wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Tabelle 3: Antikörper p53- Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Bestell-Nr.	Verdünnung	Laufprotokoll
P53 Ab-5 murin monoklonal	ThermoFisher Scientific	MS-186-P	1:1000	s.u.

Tabelle 4: Antikörper p16-Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Bestell-Nr.	Verdünnung	Laufprotokoll
p16 ^{INK4a} CINtec® Histo.	Ventana Roche Group	805-4713	Ready to use	s.u.

BenchMark XT IHC/ISH Färbemodul

1. Paraffin
2. Entparaffinierung
3. Hitzevorbehandlung
4. Cell Conditioner 1
5. Mildes CC1 (60 Min. bei pH 8,4)
6. Standard CC1
7. Titration
8. Handauftrag (Primär- Antikörper für p53 // E6H4 Histo für p16), Inkubation für 36 Min. für p53 // 28 Min. für p16
9. ultraWash
10. Gegenfärbung
11. 1 Tropfen (Hämatoxylin) (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für 4 Min. inkubieren
12. Nach-Gegenfärbung
13. 1 Tropfen von (Bluing Reagent) nach Gegenfärbung auftragen, LCS auftragen, Inkubation für 4 Min.

Die gefärbten Schnitte wurden lichtmikroskopisch mittels des Remmele Scores (Immunreaktiver Score, IRS) semiquantitativ ausgewertet. Dabei wird dem prozentualen Anteil positiver Zellen und der Intensität des Färbeergebnisses jeweils ein Zahlenwert zugewiesen. Das Produkt dieser beiden Werte ergibt den IRS. Es resultiert ein Wert zwischen 0 und 12:

Tabelle 5: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele (Remmele & Stegner, 1987)

Punkte	Färbeintensität	Anteil positiver Zellkerne
0	keine Färbung	0%
1	schwach	< 10%
2	mäßig	11% - 50%
3	stark	51% - 80%
4	-	81% - 100%

Bei der IHC für p53 wird ausschließlich der Kern angefärbt, bei p16 das Zytosol. Der p16-Antikörper färbt bei einigen Zellen jedoch auch den Zellkern mit an. Daher wurde bei allen p16-Fällen zusätzlich der prozentuale Anteil an Zellen bestimmt, deren Kerne mit angefärbt wurden. Dieser Anteil wurde gleich den Zellen mit gefärbtem Zytosol ebenfalls mit den Werten 0-4 belegt:

Tabelle 6: p16-IHC-Färbung Kerne

p16-AK: (gefärbte Kerne)	0 (Keine)	1 (1%-10%)	2 (11%-50%)	3 (51%-80%)	4 (> 80%)
-----------------------------	--------------	---------------	----------------	----------------	--------------

Nach der neuen WHO Einteilung der Ovarialkarzinome von Herbst 2014 (Kurman & Carcangiu ML, 2014) zeigte sich jedoch, dass die p53 – Expression auf zwei verschiedene Arten mit einer TP53 - Mutation korreliert: Entweder eine starke diffuse nukleäre Färbung (in >60% der Fälle), die mit einer Missense-Mutation korreliert. Oder das völlige Fehlen einer Färbung, was mit einer Nonsense-Mutation korreliert. Es kommt zu keiner Färbereaktion, da die Nonsense-Mutation zu einem abgeschnittenen Protein führt, welches vom p53 - Antikörper nicht erkannt wird. Es können also nur diejenigen Zellen p53-positiv (mutiert) sein, die entweder sehr stark oder gar nicht angefärbt wurden. Daher erfolgte eine Reevaluierung der p53-gefärbten Schnittpräparate.

Bezüglich der p16-Expression wurde in der WHO von 2014 dargelegt (Altman et al., 2013), dass eine Mutation dann angenommen werden kann, wenn eine diffuse, gleichmäßig starke Färbung von >90% der Zellen vorliegt, während bei <90% angefärbten Zellen mit einer zudem unregelmäßigen Anfärbung keine Mutation vorliegt (s. Ergebnisteil).

3.3 Pyrosequenzierung

3.3.1 HE-Färbung

Ein Leerschnitt pro Patientin wurde für eine Hämatoxilin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) verwendet.

Automatenfärbung Hämatoxilin-Eosin

Pathologisches Institut, LMU München

1. Startposition	
2. Trockenstation	12 min.
3. Xylol	2 min.
4. Xylol	2 min.
5. 100% EtOH	1 min.
6. 96% EtOH	1 min.
7. 70% EtOH	1 min.
8. Reinigungsstation	30 sek.
9. Hämalaun	6 min.
10. Reinigungsstation	4 min.
11. 70% EtOH	1 min.
12. Eosin alk.	2 min. 30 sek.
13. 96% EtOH	1 min.
14. 96% EtOH	1 min.
15. 100% EtOH	1 min.
16. Xylol	2 min. 30 sek.
17. Endposition	

Gebrauchsfertige Lösungen:

- Aqua bidest.
- Xylol
- 100%, 96%, 70% Ethanol
- Hämalaun nach Mayer
- Eosin alkoholisch

Ergebnis:

Zellkernfärbung (Hämalaun) → blau

Zellbestandteile (Eosin) → hellrosa bis pink

3.3.2 DNA-Isolierung des Tumormaterials

3.3.3 Entparaffinierung der Leerschnitte

Die Menge der benötigten Leerschnitte orientiert sich an der Größe der markierten Tumorfläche auf dem HE-Schnitt. Ziel war das Erreichen einer Fläche von ca. 2cm², etwa die Fläche eines Daumennagels. Hierfür wurden in der Regel drei bis vier Leerschnitte benötigt. Zur schrittweisen Aufreinigung wurden die Schnittpräparate zuerst mit Hilfe von Xylolbädern (für je 8 Minuten) entparaffiniert und anschließend zur Auswaschung des Xylols für je 8 Minuten in drei aufeinanderfolgende Ethanolbäder (Ethanol 100%) getaucht. Danach erfolgte das Trocknen der Präparate bei Raumtemperatur.

3.3.4 Auskratzen der Leerschnitte

Auf dem o.g. HE-Schnitt wurden die Tumorareale unter mikroskopischer Kontrolle mit einem Permanentmarker per Hand umkreist. Dieser Schnitt diente im nächsten Schritt als Vorlage, um die Lokalisation der Tumorareale auf den ungefärbten Leerschnitten zu markieren, da hier keine lichtmikroskopische Unterscheidung von Tumor und normalem Gewebe möglich ist.

Hierbei wurden der HE-Schnitt und ein Leerschnitt übereinandergelegt und die Markierung per Hand mit einem Permanentmarker auf der Rückseite des Leerschnittes nachgefahren. So wurden die unter mikroskopischer Kontrolle bestätigten Lokalisationen der Tumorareale auf die Leerschnitte übertragen.

Je nach Größe der Tumorareale wurden entsprechend viele der Leerschnitte zur DNA-Isolierung verwendet, um genügend Zellmaterial zu erhalten

Abbildung 16: HE-Schnitt mit markiertem Tumoreal

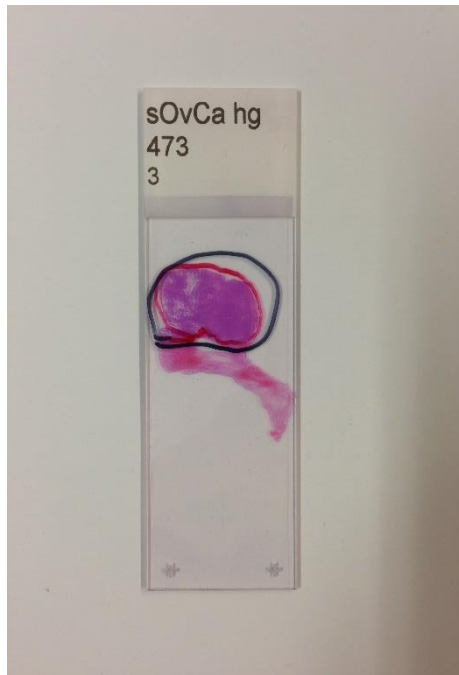
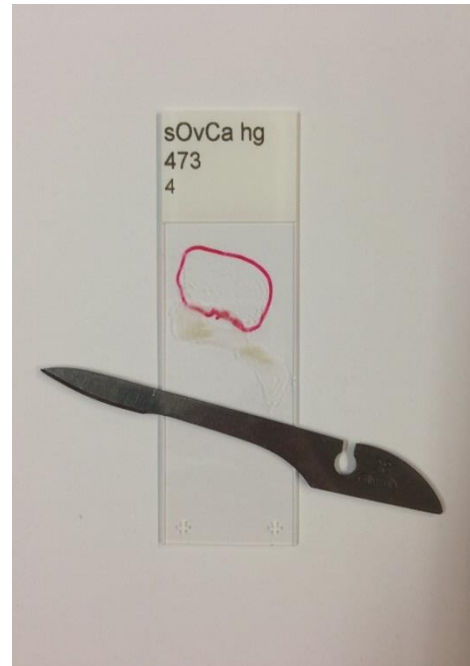


Abbildung 15: Zugehöriger Leerschnitt, mit dem Skalpell ausgekratzt



3.3.5 Tumor-DNA-Isolierung im QiaCube

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

Inhalt: Kit Contents

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)

Catalog no. 56404

Number of preps 50

QIAamp MinElute®Columns 50

Collection Tubes (2 ml) 3 x 50

Buffer ATL 10 ml

Buffer AL 12 ml

Buffer AW1 (concentrate) 19 ml

Buffer AW2 (concentrate) 13 ml

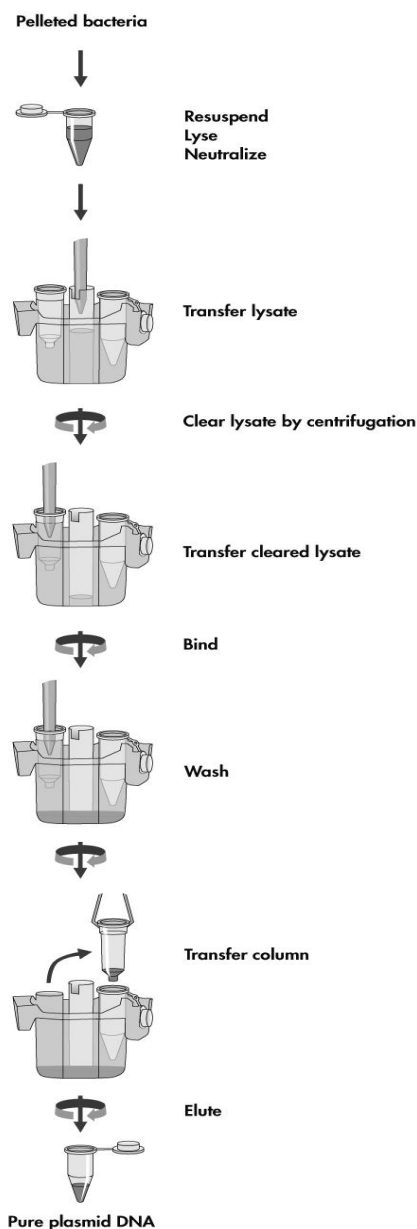
Buffer ATE 12 ml

Proteinase K 1.25 ml

Abbildung 17: QiaCube der Qiagen GmbH



QIAprep Miniprep Standard Procedure



Der erste Schritt, die Lyse der Gewebeproben, wurde per Hand durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten automatisiert im QiaCube. Der Prozess im QIAcube erfolgte mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit Standard Protocol 1703: Isolierung von genomischer DNA.

1. Lyse der Gewebeproben

Es wurden in 2ml-Röhrchen (Tubes) 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K pipettiert. Die auf der Rückseite umrandeten Tumoreareale wurden so exakt wie möglich mit einer Skalpellklinge ausgekratzt und das an der Skalpellspitze haftende Gewebe in das vorbereitete Tube gegeben. Dieser Ablauf wurde mit so vielen Leerschnitten wiederholt, bis eine ausreichende Menge an Tumormaterial im Tube gesammelt werden konnte

(eine Fläche von etwa 2 cm² bis 2,5 cm²). Anschließend erfolgte die Inkubation im Thermocycler bei 400rpm und 56°C für genau 60 Minuten.

2. Binden der DNA an die Membran der Säulengefäße

Jeder Probe werden AL-Puffer, ATL-Puffer und Ethanol zugegeben. Die Proben werden gevortext und bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Inhalt der Tubes in die Säulen transferiert. Das Lysat wird nun durch Zentrifugierung durch die Säule gepresst. Die DNA bindet nun an die Kieselmembran, während der Überschuss in einem Auffangbehälter unter der Säule gesammelt wird.

3. Waschen der Membran

Es wird zuerst AW1-Puffer und dann AW2-Puffer zugegeben und dazwischen und danach zentrifugiert. Durch diesen Waschschrift werden Kontaminierungen vermieden.

4. Eluieren der DNA

Die Säulen werden den 1,5ml-Tubes aufgesetzt und ATE-Puffer hinzugegeben. Anschließend wird zentrifugiert. Die Auswaschung (Elution) der gereinigten DNA erfolgt durch Zentrifugalkraft. Die Säulen werden verworfen. Am Ende erhält man reine DNA in ATE-Puffer (Lagerungspuffer) in 1,5ml- Sammel-Tubes. Das Volumen des ATE-Puffers ist variabel, für diese Arbeit wurden 20µl gewählt. Die DNA wird bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Bei häufigem Gebrauch werden Aliquots angelegt, die bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR):

Aus FFPE-Material kann nur wenig DNA isoliert werden. Dies liegt am Konservierungsverfahren und eventuell am Alter der Proben. Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurden die gewonnenen DNA-Moleküle vervielfältigt. Die PCR ist somit ein wichtiger Zwischenschritt, um die aus dem Tumorgewebe gewonnene DNA für die Pyrosequenzierung vorzubereiten.

Die folgende Abbildung zeigt das Pipettierschema sowie die Zusammensetzung der PCR, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde. In der zweitletzten Spalte ist der Ansatz mit 40 µl für eine Probe abgebildet, in der letzten Spalte der Mastermix für 24 Proben. Die Ansätze werden in 8er Strip PCR Tubes von je 0,2ml Volumen pipettiert.

Tabelle 7: PCR- Ansatz

master

	24		Ansätze			
	stock		f.c.		1x	MM
H2O					30,80	739,20
10xbuffer	10	x	1,0	x	4,00	96,00
MgCl₂	25	mM	1,5	mM	2,40	57,60
dNTP	10	mM	0,2	mM	0,80	19,20
primer Mix	20	µM	0,4	µM	0,80	19,20
Taq-Pol	5	U/µl	1,0	U	0,2	4,80
					40	

DNA					1,0	
------------	--	--	--	--	-----	--

Für die PCR wurden folgende Amplifikationsprimer verwendet:

Tabelle 8: PCR Amplifikationsprimer KRAS

KRAS	Primer	Sequenz
P1	D361 KRAS-Pyro-F1	NNNGGCCTGCTGAAAATGACTGAA
P1	D362 KRAS-Pyro-R1-BIO	TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT

Tabelle 9: PCR Amplifikationsprimer BRAF

BRAF	Primer	Sequenz
P4	D0376 BRAF-Ex15-Pyro-F1	TGAAGACCTCACAGTAAAAATAGG
P4	D0377 BRAF-Ex15-Pyro-R1-BIO	TCCAGACAACTGTTCAAACCTGAT

Die Primer bestimmen den Startpunkt der Polymerase auf der DNA. Es wird derjenige Abschnitt auf der DNA vervielfacht, der zwischen diesen beiden Amplifikations-Primern liegt. In dieser Arbeit wurden speziell die Gene KRAS und BRAF auf der DNA der Ovarialkarzinomzellen vermehrt. Das Vorgehen der PCR unterschied sich lediglich in den verwendeten Primern. Die Zusammensetzung der PCR sowie die Menge der einzelnen Inhaltsstoffe waren für die Gene KRAS und BRAF identisch. Die Reaktion lief in einem Thermocycler ab. Aufgrund der

Temperaturschwankungen wurde eine sogenannte Hot Start Taq-Polymerase verwendet. Diese wurde durch eine initiale zweiminütige Erhitzung auf 94°C aktiviert.

Ablauf der PCR-Reaktion:

1. Denaturierung:

Zunächst muss die doppelsträngige DNA in ihre beiden Einzelstränge geteilt werden. Hierfür wird die DNA auf 94°C erhitzt und für 30 Sekunden auf dieser Temperatur gehalten. Dieser Schritt dient dem Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden Einzelstränge der DNA verbinden.

1. Annealing (Primer-Hybridisierung):

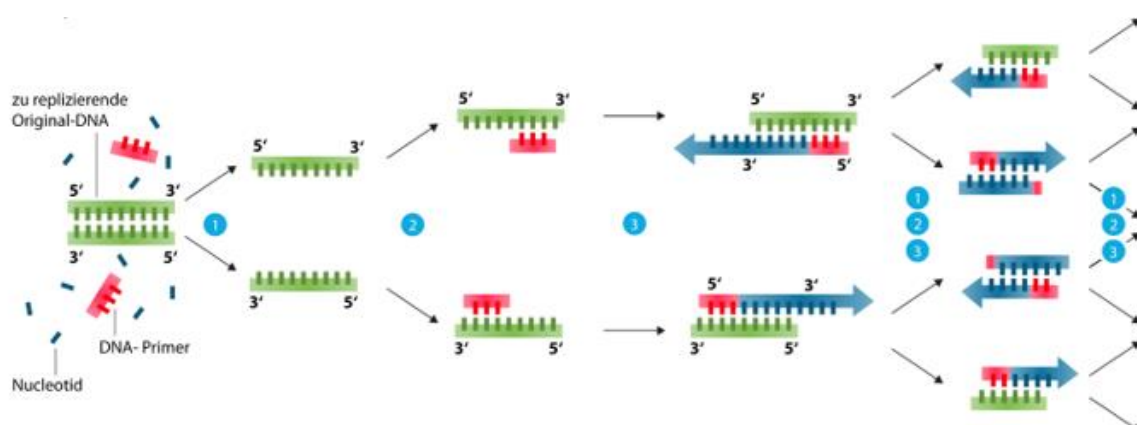
Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 60°C abgekühlt. Jetzt können sich die Primer spezifisch an die Einzelstränge der DNA-Moleküle anlagern. Die genaue Idealtemperatur hängt von der Länge und der Sequenz der Primer ab.

2. Elongation:

Nun wird die Temperatur auf 72°C angehoben. Dies ist die ideale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase. Die Polymerase beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und bildet einen neuen komplementären Strang an jeden der beiden Einzelstränge, indem sie die jeweils passenden Nukleotide anhängt. Nun sind zwei doppelsträngige DNA-Moleküle vorhanden. Das DNA-Material wurde also verdoppelt. Dieser Zyklus wird 50-mal durchlaufen. Dies führt zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Moleküle und somit der beiden Gene KRAS und BRAF aus dem DNA-Material des Tumorgewebes.

Die PCR-Produkte werden bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Schaubild:



Denaturierung bei +94°C

Annealing bei +60°C

Elongation bei +72°C

3.3.6 DNA-Gelelektrophorese

1. Herstellung des Agarose-Gels

100ml des 0,5 x TBE-Puffers werden zu 2g Agarose-Pulver in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Das Gemisch wird in der Mikrowelle für ca.1 Minute erhitzt und zum Kochen gebracht. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben unter dem laufenden Wasserhahn etwas abgekühlt. Mit einer Pipette werden 5µl Ethidiumbromid (EtBr) in das flüssige Gel pipettiert und durch Schwenken vermischt, bis sich das rot gefärbte EtBr verteilt und aufgelöst hat.

Nun wird der Gelträger in die Gießvorrichtung gestellt und drei geeignete Kämme in den Gelträger gesteckt. Das flüssige Gel wird hineingegossen. Nach ca. 30 Minuten ist das Gel auf Raumtemperatur abgekühlt und hart geworden. Der Gelträger mit dem Gel wird in der Elektrophoresekammer so platziert, dass das gesamte Gel von TBE-Puffer bedeckt ist. Die Kämme werden entnommen. Die dadurch entstandenen Öffnungen, Brunnen genannt, füllen sich mit dem Puffer. In 0,2ml Tubes wird je 1µl PCR-Produkt mit 5µl Blaupuffer pipettiert. Das Gemisch wird vorsichtig in die Brunnen pipettiert. Da das Gemisch dichter als das Gel ist, sinkt es auf den Grund der Öffnungen ab. Dabei ist darauf zu achten, das Gel nicht mit der Pipettenspitze zu beschädigen. Links und rechts von 8 PCR-Proben wird jeweils 1µl einer DNA-Leiter, die Low Range DNA Ladder (25 bp bis 700 bp) pipettiert, sodass sich für das Auge übersichtliche Gruppen von je 10 Brunnen ergeben. Die DNA Ladder fungiert als Größenstandard für die Abschätzung der Basenpaar-Länge (bp) der DNA-Fragmente.

2. Elektrophoresekammer

Die Auftrennung erfolgt in einer Horizontal-Gelelektrophoresekammer. Das Gerät wird bei 120 Volt und 400 mAmp eingeschaltet und für ca. 30 Minuten laufen gelassen, bis die Banden etwa über eine Strecke von zwei Dritteln der Länge des Gels migriert sind. Hierdurch ergibt sich eine anschauliche Bandenlänge.

3. Fluoreszenzaufnahmen erstellen

Das Gel wird per Hand entnommen und in die Fotokammer gelegt. Es wird mittels der AlphaEaseFC-Software ein Fluoreszenzfoto erstellt, einmal als Negativaufnahme und einmal als Positivaufnahme. Dabei wird das beigemischte Ethidiumbromid unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar gemacht. (Multimage Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation).

Durch die Gelelektrophorese kann neben der Abschätzung der DNA-Länge überprüft werden, ob die PCR funktioniert hat. Im Laufe dieser Arbeit wurde diese Methode regelmäßig stichprobenartig angewandt.

3.3.7 Durchführung der Pyrosequenzierung

1. Pyromark Q24 Software

Am Computer wird mithilfe der Software Pyromark Q24 der Run kreiert. Dazu wird die entsprechende Anzahl der Proben, maximal 24, ausgewählt und benannt. Das korrekte Assay für den entsprechenden Primer, KRAS Ex2 Ogino und BRAF Ex15, wird ausgewählt und der vorbereitete Run auf dem USB-Stick gespeichert. Das bei jedem einzelnen Run benötigte Volumen für Enzym, Substrat und Nukleotide wird von der Software berechnet.

2. Vorbereitung

Das Pipettierschema ist für beide Gene KRAS und BRAF identisch, nur der Sequenzierungsprimer wird ausgetauscht:

Verwendete Sequenzierungsprimer:

Tabelle 10: PCR Sequenzierungsprimer KRAS

KRAS	Name	Sequenz
Primer	D0363 KRAS-Pyro-S1	TGTGGTAGTTGGAGCT

Tabelle 11: PCR Sequenzierungsprimer BRAF

BRAF	Name	Sequenz
Primer	D0378 BRAF-Ex15-Pyro-S1	GTAAAAATAGGTGATTTTGG

Alle verwendeten Substanzen werden auf Raumtemperatur gebracht. Zunächst wird ein 65µl-Mastermix für die entsprechende Menge der Proben hergestellt. Dieser

besteht aus 1 µl Streptavidin-ummantelte Sepharose-Beads, 40 µl Binde-Puffer und 25 µl Aqua bidest für jeden Ansatz. Die Beads werden zuvor durch leichtes Schütteln zur Suspension gebracht. Der Mix wird in die PCR-Platte pipettiert. Anschließend werden in jedes Well je 15 µl PCR-Produkt einer Gewebeprobe hinzugegeben. Die Platte wird anschließend für 5 Minuten bei 1400 rpm auf dem Monoshaker inkubiert. Hierbei wird die DNA aus der PCR an die Sepharose-Beads gekoppelt. Die folgende Abbildung zeigt das verwendete Pipettierschema.

Tabelle 12: Pipettieranleitung: Sepharose Beads-Mix und Primer-Mix

PCR-Produkte - Beads							
	12 Ansätze						
	1x						
beads	1	12					
binding buffer	40	480					
PCR	15						
Wasser	24	288					
Summe	80	960					
					15 µl PCR Produkt		
					65 µl Mix		
Primer							
	12 Ansätze				stock	100 µM	
					10x	3 µM	
primer (10x; 3µM)	2,5	30,0	f.c. 0.3 µM				
annealing buffer	22,5	270,0			10xprimer (3µM)		
Summe	25	300,0			annealing buffer	97 µl	
					100 µM primer	3 µl	

Währenddessen wird die Vakuumpumpe eingeschaltet und die Saugfähigkeit in einem Wasserbecken getestet. Anschließend wird der Primermix hergestellt. Hierfür werden für jeden Ansatz 2,5 µl Sequenzierungsprimer und 22,5 µl Annealing-Puffer in eine weitere Platte pipettiert. Nach der Inkubation werden die PCR-Platte und die Primer-Platte auf den dafür vorgesehenen Positionen in der Vakuum Prep Station platziert. Anschließend wird die Waschstraße durchlaufen.

Abbildung 18: Pyrosequenzierung Saugkopf



Abbildung 19: Pyrosequenzierung Waschstraße



Die Waschstraße besteht aus 5 Becken. Im ersten befindet sich Ethanol 100%, im zweiten „Denaturation Solution“ und im dritten Wasch-Puffer. In den beiden übrigen Becken befindet sich Aqua bidest zur Spülung des „Vakuum Prep Tools“ (Saugkopf). Der an die Beads gekoppelte PCR-Mix wird nun mit dem Vakuum Prep Tool angesaugt. Hierbei verfangen sich die Beads mit dem PCR-Produkt in den Saugstiften, während die Flüssigkeit über den Schlauch in einen Behälter fließt. Nun

wird das Vakuum Prep Tool mit den Saugstiften nacheinander für je 10 Sekunden in die ersten drei Becken getaucht. Dadurch wird die DNA schrittweise gewaschen und denaturiert. Es entsteht Einzelstrang-DNA, die direkt für die Sequenzierung genutzt werden kann. Nach Durchlaufen der ersten drei Becken werden die Saugstifte für etwa 5-10 Sekunden senkrecht gehalten und so an der Luft getrocknet.

Im letzten Schritt werden die Kugeln über der Primerplatte in Position gebracht und der Saugmotor ausgeschaltet. Durch leichtes Rütteln werden die Beads mit der gewaschenen DNA auf die Primer-Platte transferiert. Direkt danach wird die Platte für genau 2 Minuten bei 80°C auf der Heizplatte inkubiert. Danach wird die Platte einige Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

Währenddessen wird die Cartridge (Kartusche) mit Enzym, Substrat und den Nukleotiden gemäß den von der Software angegebenen Volumina befüllt. Cartridge und Platte werden an den dafür vorgesehenen Positionen im Pyrosequencer platziert und die Cartridge mit einem kleinen Bügel arretiert.

Das Gerät wird geschlossen und der auf dem USB-Stick gespeicherte Run gestartet.

3. Ablauf der Sequenzierungsreaktion

Die Pyrosequenzierung ist eine effektive und einfach zu reproduzierende Technik mit hoher Lesegenauigkeit, mit der die Basenabfolge bestimmter Gene ermittelt wird. Sie beruht auf der enzymvermittelten Entstehung eines vom Gerät detektierten Lichtblitzes für jedes korrekt eingebaute Nukleotid. Im Detail läuft die Reaktion in fünf Schritten ab:

Schritt 1: Die denaturierte DNA liegt nach der Vorbereitung als Einzelstrang vor und wird mit dem Sequenzierungsprimer hybridisiert. Anschließend erfolgt die Inkubation zusammen mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase, Apyrase und deren Substraten Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) und Luciferin.

Schritt 2: Nun wird der Reaktion das erste Desoxiribonukleotid-Triphosphat zugefügt. Wenn es zur nächsten Base komplementär ist, dann katalysiert die DNA-Polymerase den Einbau des dNTPs durch den Primer. Jedem Einbau eines dNTPs folgt die Freisetzung einer gleich großen Menge an Pyrophosphat (PPi). Anstelle von dATP wird Desoxyadenosin-Alpha-Thio-Triphosphat (dATPαS) verwendet, da es von der DNA-Polymerase effizient in den DNA-Strang eingebaut, jedoch nicht von der Luciferase erkannt wird.

Schritt 3: Die ATP-Sulfurylase wandelt das PPi in Gegenwart des Adenosin-5'-Phosphosulfat zu ATP um. Das entstandene ATP katalysiert wiederum die Luciferase-vermittelte Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion entsteht sichtbares Licht proportional zur Menge an ATP. Dieser Lichtblitz aus der Luciferase-katalysierten Reaktion wird von CCD-Sensoren registriert und als Peak im Pyrogramm sichtbar. Die Höhe jedes Peaks ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide.

Schritt 4: Das Enzym Apyrase baut kontinuierlich Nukleotide und ATP ab, die nicht eingebaut wurden bzw. für keine Reaktion benötigt wurden. Nach dem vollständigen Abbau aller unverbrauchten Moleküle wird der Reaktion ein weiteres Nukleotid hinzugefügt.

Schritt 5: Die dNTPs werden der Reaktion einzeln und nach einander zugefügt und jeweils vor Zugabe des nächsten komplett abgebaut. Auf diese Weise weiß der Pyrosequencer zu jeder Zeit, welches Nukleotid sich gerade in der Reaktion befindet. Im Laufe des Prozesses wird der komplementäre DNA-Strang synthetisiert und die Nukleotid-Sequenz kann von den Signal-Peaks im Pyrogramm abgelesen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie p53 und p16:

4.1.1 Ergebnisse der p53-Immunhistochemie

Im Laufe der Arbeit musste diese Einteilung jedoch (s. Kapitel 3.3) angepasst werden. Im Jahr 2014 erschien die neue WHO-Einteilung für das Ovarialkarzinom. Hier zeigte sich, dass es entweder zu einer sehr starken diffusen Anfärbung von p53 (missense mutation) oder zum völligen Fehlen der Anfärbung kommt (nonsense mutation). Dies wurde im Kapitel 3.2 im Methodenteil ausführlicher beschrieben.

Zur Übersicht hier die alte Einteilung nach dem Immunreaktiven Score von Remmele:

Tabelle 13: p53 nach dreistufigem Score anhand der Färbeintensität

Färbeintensität	0	1	2	3
Prozentsatz	37 (24,3%)	25 (16,4%)	23 (15,1%)	67 (44,1%)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fälle mit Intensität 0 und mit Intensität 1 zusammengekommen als negativ gewertet. Demnach tragen also 62 der HGSC (40,7%) eine TP53- Nonsense Mutation und 67 der HGSC (44,1%) eine TP53-Missense Mutation.

23 der HGSC (15,1%) tragen eine schwache Anfärbung und somit keine TP53-Mutation.

Auf den IRS bezogen wurde die neue Einteilung gemäß WHO 2014 wie folgt vorgenommen:

Die Ovarialkarzinome mit IRS 0, 1, 2 und 4 (71 Fälle) wurden als negativ (Nonsense-Mutation) gewertet, diejenigen mit RS 9 und 12 (65 Fälle) als stark positiv (Missense-Mutation). Übrig blieben die Fälle mit RS 6 und RS 8 (16 Fälle). Diese Karzinome stellen eine Zwischenstufe dar, die laut neuer WHO-Einteilung nicht als p53-Mutation angesehen werden dar.

Tabelle 14: p53 nach klassischem IRS

IRS	0-2 (negativ)	3-4 (schwach)	6-8 (mäßig)	9-12 (stark)
Prozentsatz	65 (42,7%)	6 (3,9%)	16 (10,5%)	65 (42,7%)

Tabelle 15: p53 nach neuer WHO 2014

Färbung	Positiv (IRS= 9;12) (missense mutation)	Negativ (IRS= 0;1;2;3;4) (Nonsense mutation)	Gesamt
Anteil der Fälle	65 (42,8%) (laut WHO 60%)	71 (46,7%)	136 (89,5%)

Tabelle 16: Laut WHO 2014 Zwischenstufen: nicht p53-mutiert

Färbung	IRS=6	IRS=8	Gesamt
Anteil der Fälle	7 (4,6%)	9 (5,9%)	16 (10,5%)

In sieben Fällen fand sich ein IRS von 6, in 9 Fällen ein IRS von 8, die beide als mittelstark und somit als p53-Wildtyp eingestuft wurden. Insgesamt handelt es sich um 16 Fälle (10,5%).

4.1.2 Ergebnisse der p16-Immunhistochemie:

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen der p16-Mutationen ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 17: p16 nach klassischem IRS

IRS	0-2 (negativ)	3-4 (schwach)	6-8 (mäßig)	9-12 (stark)
Prozentsatz	15 (9,9%)	14 (9,2%)	24 (15,8%)	99 (65,1%)

Tabelle 18: p16- prozentualer Anteil gefärbter Kerne

Anteil gefärbter Kerne	0 (0%)	1 (1-10%)	2 (11-50%)	3 (51-80%)	4 (>80%)
Anzahl (%)	3 (1,9%)	15 (9,9%)	18 (11,8%)	24 (15,8%)	92 (60,5%)

Tabelle 19: p16 nach dreistufigem Score anhand der Färbeintensität

Färbeintensität	0	1	2	3
Prozentsatz	3 (1,9%)	10 (6,6%)	35 (23,0%)	104 (68,4%)

Um die neue WHO von 2014 auf p16 anzuwenden, wurde folgendermaßen vorgegangen: Als positiv werden laut WHO diejenigen Fälle angesehen, bei denen sich eine diffuse gleichmäßig starke Anfärbung in >90% der Zellen zeigt. Daher wurden in dieser Arbeit diejenigen Fälle als positiv gewertet, die nach dem immunreaktiven Score (IRS) einen Wert von 12 erreicht haben. Diese Fälle korrelieren gut mit den Kriterien der WHO: Sie zeigen eine starke Anfärbung (Grad 3), und das in >80% der Zellen.

Im vorliegenden Kollektiv sind 87 Fälle (57,2%) als überexprimiert (mutiert) zu werten (gleichmäßig starke Anfärbung [„block staining“] in >80% der Zellen).

65 Fälle (42,8%) sind als negativ (Wildtyp) zu werten (unregelmäßige schwächere Anfärbung [„patchy staining“] in <80% der Zellen) (Kurman & Carcangiu ML, 2014).

Tabelle 20: p16 nach neuer WHO 2014

Färbung	„Diffuse block staining“ (IRS 12)	Patchy staining“ (IRS 0-9)
Anteil der Fälle	87 (57,2%)	65 (42,8%)

Im Folgenden sind einige Beispielbilder der Immunhistochemie aufgeführt:

Abbildung 20: HGSC p53 10x Vergrößerung

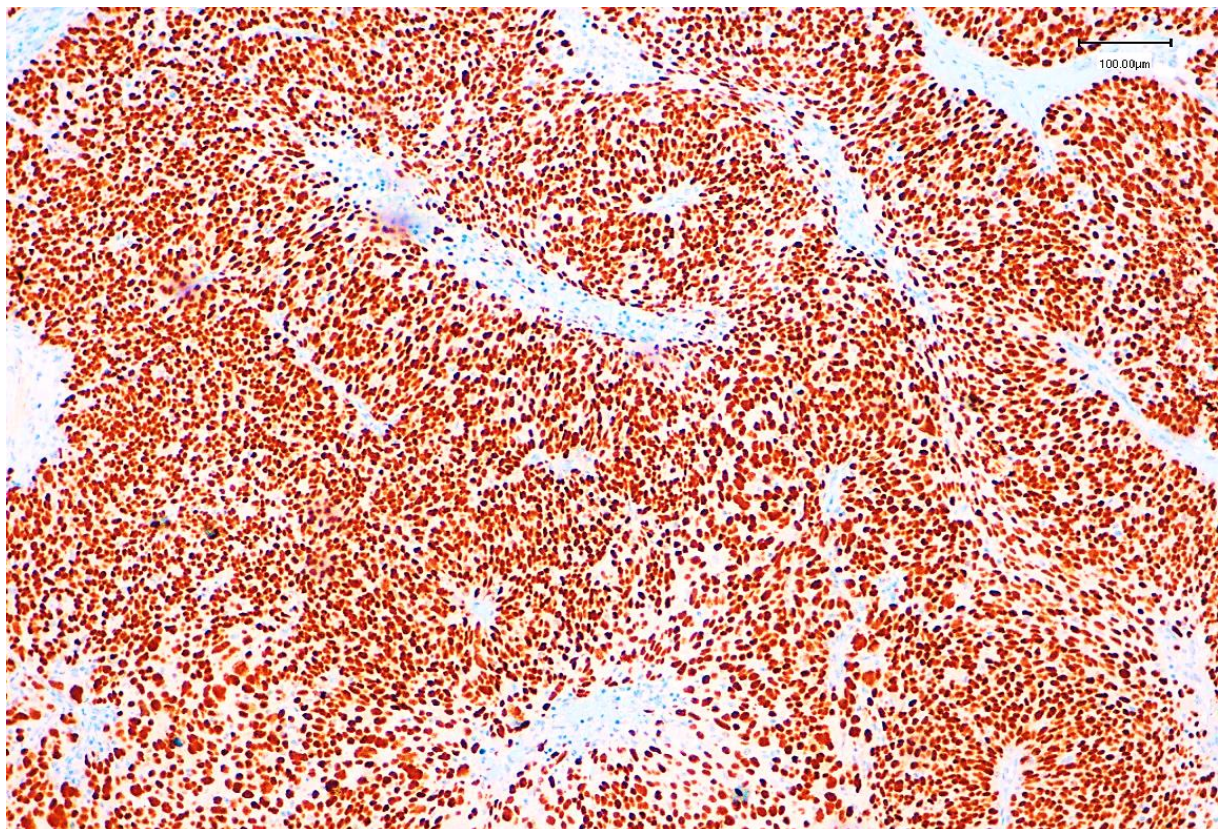


Abbildung 21: HGSC p16 20x Vergrößerung

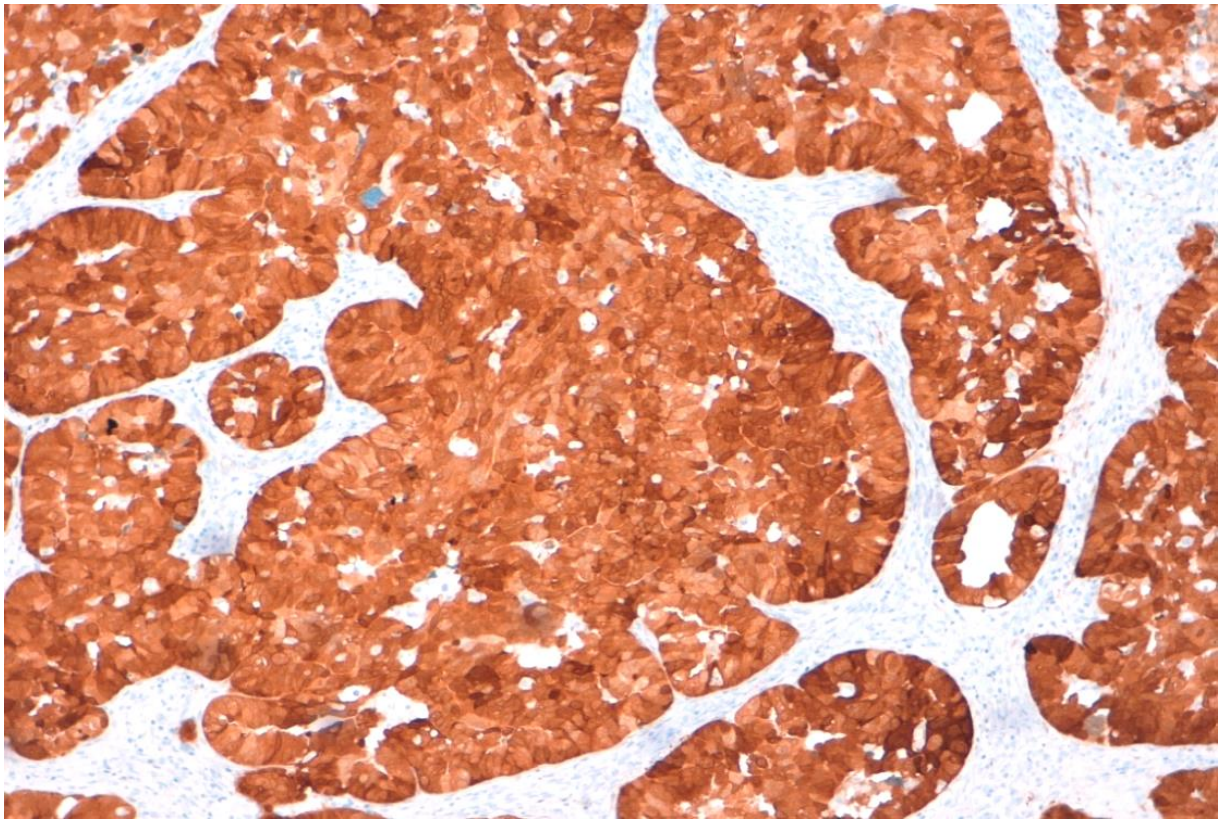


Abbildung 22: LGSC p53 10x Vergrößerung

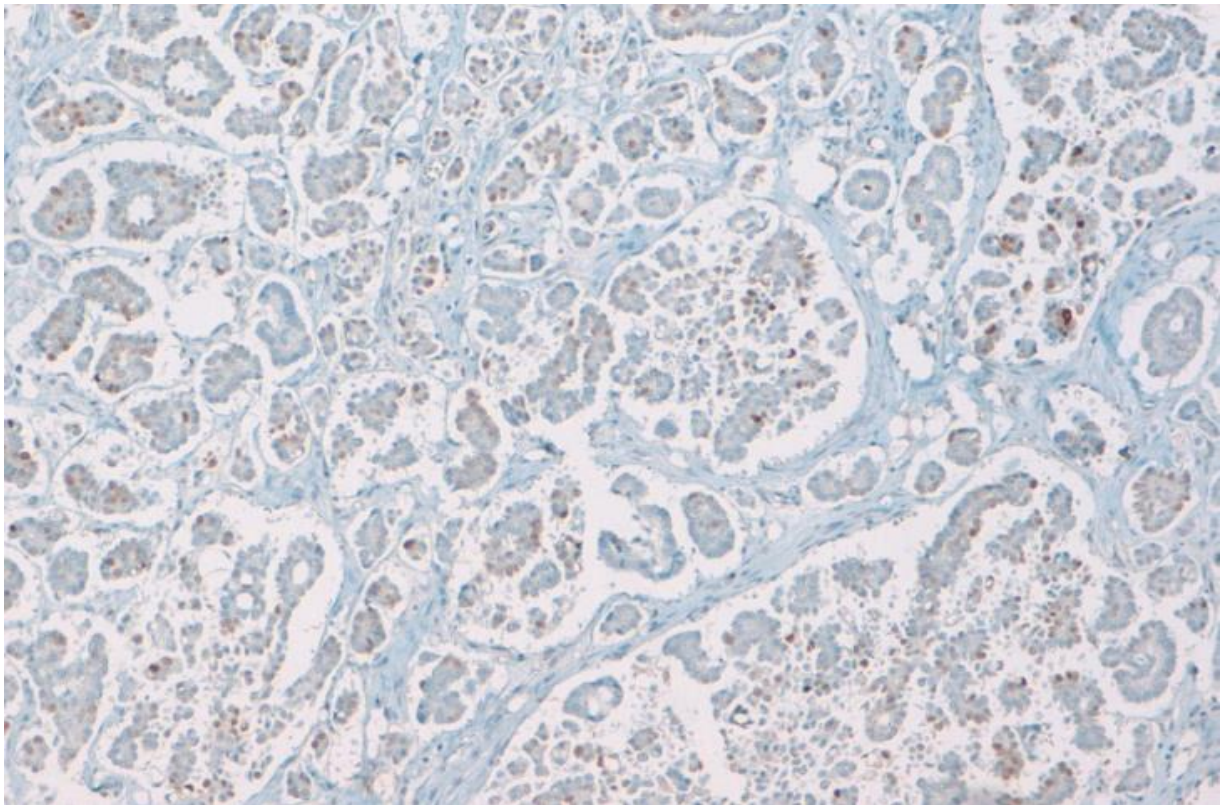
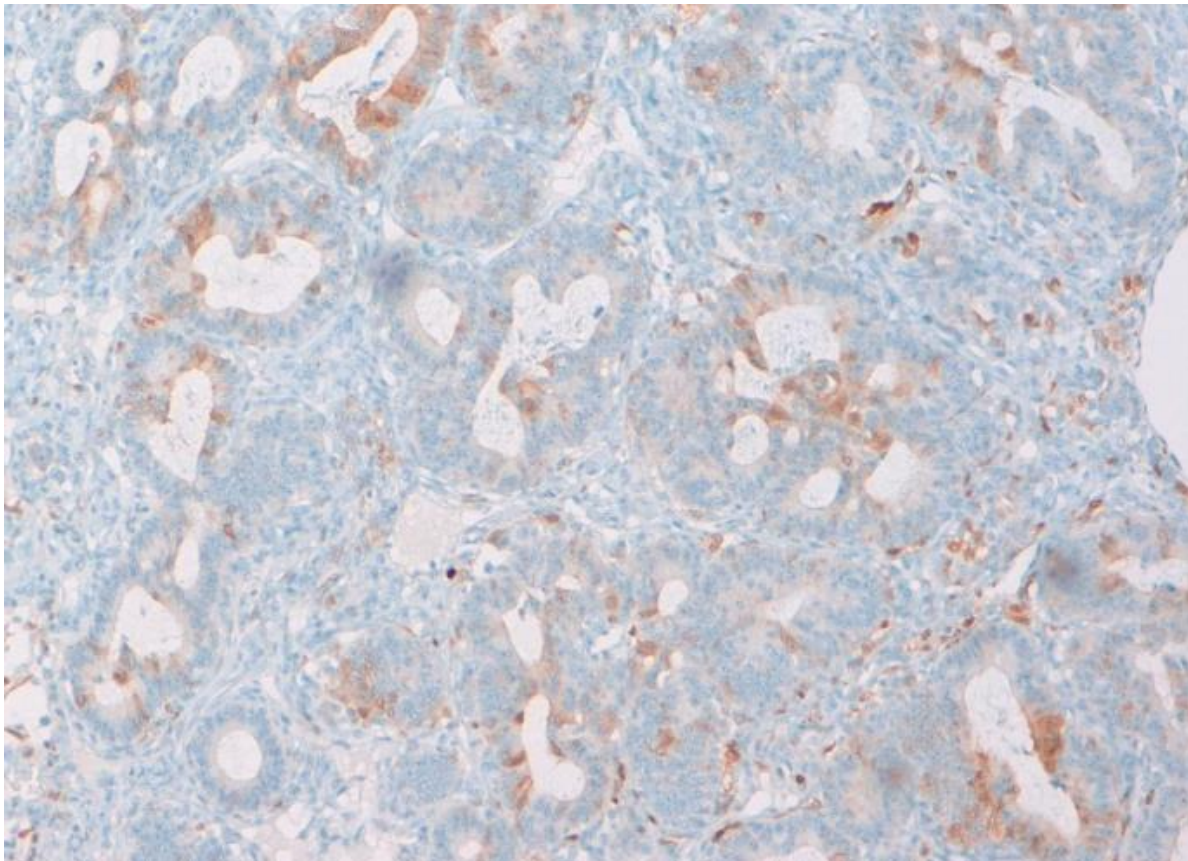


Abbildung 23: LGSC p16 10x Vergrößerung



4.2 Mutationsanalysen

4.2.1 KRAS

Bei den Mutationsanalysen aller 152 Fälle wurden in 6 Fällen KRAS-Mutationen nachgewiesen. Untersucht wurde das Exon 2 des Gens KRAS. Es wurden zwei verschiedene Punktmutationen gefunden. Zum einen die Mutation c.35G>A -p. G12D. Hier wurde ein Guanodin gegen ein Adenosin ausgetauscht. Dies betrifft die Aminosäure Aspartat. Zum anderen die Mutation c.35G>T – p. G12V. Hier wurde ein Guanodin gegen ein Thymin ausgetauscht. Dies betrifft die Aminosäure Valin. Zur Verdeutlichung sind die beiden Mutationen im Folgenden als Schaubilder der Pyrosequenzierung dargestellt. Zum Vergleich ist auch das Schaubild des Wildtyps (nicht mutiert) dargestellt.

Abbildung 24: KRAS-Mutation 1: c.35G>A -p.G12D (Aspartat)

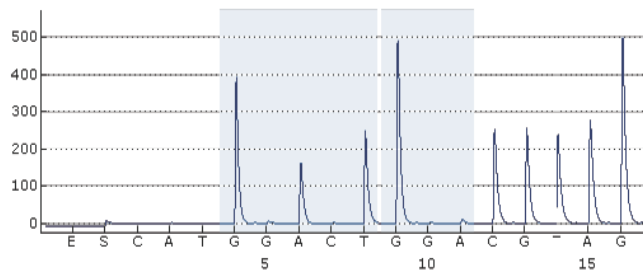


Abbildung 25: KRAS-Mutation 2: c.35G>T - p.G12V (Valin)

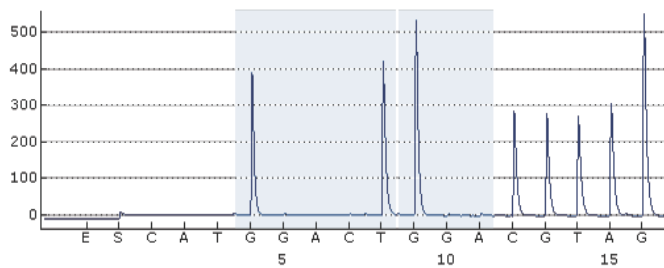


Abbildung 26: KRAS Wildtyp Exon 2

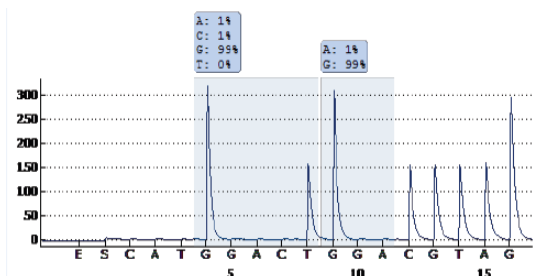


Tabelle 21: Übersicht KRAS-Mutationen

	c.35G>A p.G12D (Aspartat)	c.35G>T p.G12V (Valin)	Gesamt	Keine
KRAS (serös)	2	4	6 (3,9%)	148

KRAS-mutierten Fälle mit ihren korrespondierenden immunhistochemischen Ergebnissen:

Archivnummer		p53: Intens. %		IRS	p16: Int. %		IRS:		
1.	7	3	3	9	3	4	12		
2.	399	2	1	2	3	2	6		
3.	413	0	0	0	1	1	1		
4.	415	1	2	2	2	2	4		
5.	709	AK14115/99		2	1	2	2	3	6
6.	750	AK5884/98		1	1	1	2	3	6

Die Fälle 413 (p53-Intensität 0) und 415/750 (p53-Intensität 1) haben ein p53-negatives Färbemuster und tragen somit eine p53-Nonsense Mutation. Der Fall 7 hat eine Intensität von 3 und trägt eine p53-Missense-Mutation.

Die Fälle 7/399 (Intensität 3) und der Fall 413 (Intensität 1) wurden als p16-mutiert gewertet.

Der Fall 709 hat eine KRAS-Mutation, aber keine p53- oder p16-Mutation.

All diese Fälle weisen Mutationsmuster auf, die nicht zur dualen Tumorgenese-theorie passen. Auf diesen Umstand wird in der Diskussion näher eingegangen.

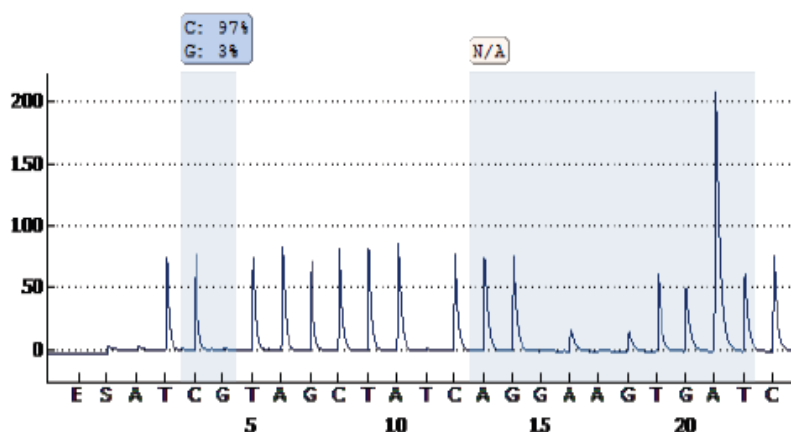
4.2.2 BRAF

Bei der BRAF-Mutationsanalyse wurde in einem der 152 Fälle eine Mutation im Gen BRAF gefunden. Es handelte sich um die Mutation c.1799T<A p. V600E. Diese Punktmutation betrifft die Aminosäure Valin, die durch Glutaminsäure ersetzt wird.

Schaubild der Pyrosequenzierung:

Abbildung 27: BRAF Mutation: c.1799T<A p. V600E: „Austausch von Valin durch Glutaminsäure“
Mutation: GTG → GAG

Well: C5
Assay: BRAF Ex15 fwd_rev2_111214
Sample ID: 665
Sequence to analyze: TC/GTAGCTACG/AG/AT/A/GG/TAAATCT
Note: 21



BRAF-mutierter Fall mit seinen immunhistochemischen Ergebnissen:

Archivnummer	Intens. %		p53-IRS	Int. %		p16-IRS
665 AK14597/98	1	1	1	2	2	4

4.2.3 Ergebnisse LGSC aus demselben Kollektiv (Hartmann & Mayr et al., 2015)

Zur Überprüfung der Theorie der dualen Tumorgenese und dem Vergleich zwischen High Grade und Low Grade wurde in der Arbeitsgruppe ein Kollektiv von insgesamt 185 serösen Ovarialkarzinomen untersucht, von denen 33 Low Grade und 152 High Grade waren. Die 33 LGSC wurden von Hartmann et al. untersucht (Hartmann & Mayr et al., 2015), die 152 HGSC in der vorliegenden Arbeit.

In der Arbeit von Hartmann et al. aus dem Jahr 2015 wurden aus demselben Kollektiv wie in der vorliegenden Arbeit 48 Low Grade- Karzinome unterschiedlicher

histologischer Art untersucht. Davon waren 33 Karzinome serös (LGSC). Hierfür wurden ebenfalls die p53- Immunhistochemie und KRAS- und BRAF- Mutationsanalysen durchgeführt. Es zeigte sich in 5 Fällen eine starke diffuse Anfärbung in der immunhistochemischen Untersuchung. Diese 5 Fälle tragen somit gemäß WHO 2014 eine p53- Missense Mutation. Von den 33 serösen Ovarialkarzinomen wiesen 6 Fälle (17%) eine KRAS-Mutation auf. In einem Fall eines serösen Karzinoms zeigte sich eine BRAF-Mutation. In 22 der LGSC fand sich weder eine p53- noch eine KRAS- oder BRAF-Mutation.

Im Folgenden findet sich eine Übersichtstabelle, die alle Ergebnisse der Immunhistochemie und der Sequenzierungs-Analysen im Überblick zeigt. Zudem werden einige Daten zu den Patientinnen genannt.

4.2.4 Übersicht aller 152 untersuchten HGSC

Tabelle 22: Gesamtübersicht Ergebnisse IHC und Mutationsanalysen

Fall Nr.	Alter bei Diagnose	FI GO	Überleben (Monate)	p53 Inten.	p53 Proz.	p53 IRS	p16 Inten.	p16 Proz.	p16 IRS	p16 Kern	KR AS	BR AF	Arch. Nr.
1	64	4	14,58	3	3	9	3	4	12	4	2	0	7
2	60	2	42,25	3	4	12	3	4	12	3	0	0	9
3	63	3	6,83	3	4	12	4	3	12	4	0	0	66
4	72	3	45,58	1	1	1	4	3	12	4	0	0	146
5	36	3	707,25	3	4	12	3	4	12	3	0	0	351
6	59	3	65,50	2	4	8	3	4	12	1	0	0	352
7	63	3	236,50	0	0	0	4	3	12	4	0	0	353
8	70	3	166,50	3	4	12	3	4	12	4	0	0	354
9	59	3	100,17	3	4	12	3	4	12	4	0	0	355
10	64	4	53,58	2	4	8	3	3	9	4	0	0	361
11	80	1	97,75	2	4	8	3	4	12	4	0	0	362
12	70	4	3,25	2	3	6	1	2	2	1	0	0	363
13	75	3	148,75	3	4	12	2	4	8	3	0	0	364
14	83	1	163,50	1	2	2	2	3	6	3	0	0	366
15	67	3	20,17	3	4	12	3	4	12	4	0	0	367
16	78	2	19,58	0	0	0	3	3	9	4	0	0	368
17	73	4	39,25	1	1	1	3	3	9	3	0	0	369
18	62	3	119,08	1	1	1	3	4	12	4	0	0	371
19	52	3	87,75	3	3	9	3	3	9	4	0	0	372
20	62	4	7,67	3	3	9	2	3	6	3	0	0	378
21	77	4	4,25	1	1	1	1	1	1	1	0	0	379
22	49	4	56,42	2	1	2	2	3	6	2	0	0	386
23	47	3	44,50	2	4	8	0	0	0	0	0	0	388
24	82	3	28,17	0	0	0	1	3	3	4	0	0	390
25	67	1	4,58	2	1	2	3	2	6	3	2	0	399
26	54	3	65,33	0	0	0	3	4	12	4	0	0	402
27	78	3	31,92	3	4	12	2	2	4	1	0	0	403
28	67	3	8,08	0	0	0	3	4	12	4	0	0	404
29	51	3	60,42	3	4	12	3	2	6	2	0	0	408
30	61	3	24,08	0	0	0	3	4	12	4	0	0	409

31	74	3	0,00	0	0	0	1	1	1	1	1	0	413
32	70	3	127,42	1	2	2	2	2	4	2	2	0	415
33	68	3	44,33	0	0	0	2	2	4	2	0	0	433
34	80	3	5,33	3	4	12	3	4	12	3	0	0	436
35	70	3	85,92	0	0	0	2	2	4	2	0	0	438
36	44	3	88,50	0	0	0	3	2	6	3	0	0	439
37	73	3	73,33	4	3	12	3	4	12	4	0	0	440
38	71	3	63,83	2	2	4	2	3	6	2	0	0	442
39	71	3	157,25	0	0	0	2	1	2	2	0	0	443
40	71	3	170,42	1	1	1	1	1	1	1	0	0	444
41	65	2	68,67	1	3	3	2	2	4	2	0	0	445
42	67	3	110,58	1	2	2	3	4	12	4	0	0	447
43	53	2	0,00	1	2	2	3	4	12	4	0	0	453
44	77	3	9,33	3	3	9	1	2	2	1	0	0	455
45	48	2	564,75	3	4	12	3	4	12	4	0	0	456
46	80	3	417,58	3	4	12	1	1	1	1	0	0	457
47	51	3	66,08	0	0	0	3	4	12	4	0	0	459
48	59	3	32,67	0	0	0	3	4	12	4	0	0	461
49	67	3	110,33	0	0	0	3	4	12	4	0	0	464
50	36	3	78,92	0	0	0	3	2	6	4	0	0	465
51	68	3	433,08	3	4	12	3	4	12	4	0	0	466
52	52	3	77,67	3	4	12	2	3	6	2	0	0	467
53	57	3	66,83	3	4	12	3	4	12	3	0	0	468
54	54	3	462,58	3	4	12	3	4	12	4	0	0	470
55	69	3	13,00	2	4	8	3	4	12	4	0	0	472
56	59	3	31,50	0	0	0	3	4	12	4	0	0	473
57	81	3	37,50	3	4	12	3	4	12	4	0	0	475
58	63	3	15,58	3	3	9	3	4	12	4	0	0	476
59	65	3	112,33	0	0	0	2	4	8	4	0	0	477
60	65	3	10,58	3	4	12	3	4	12	3	0	0	479
61	76	3	26,75	1	2	2	3	3	9	4	0	0	480
62	84	3	4,25	1	1	1	2	2	4	1	0	0	481
63	29	3	25,42	2	3	6	3	4	12	4	0	0	488
64	80	4	5,33	0	0	0	3	4	12	4	0	0	498
65	63	3	116,83	3	4	12	3	4	12	4	0	0	580

Ergebnisse

66	73	3	3,83	3	4	12	3	4	12	4	0	0	583
67	69	3	116,08	1	1	1	1	1	1	1	0	0	600
68	41	3	53,42	3	2	6	3	4	12	4	0	0	601
69	75	3	15,92	0	0	0	2	1	2	1	0	0	603
70	58	3	15,42	0	0	0	2	2	4	2	0	0	607
71	48	3	0,67	3	4	12	3	4	12	4	0	0	613
72	53	3	63,67	3	4	12	3	3	9	4	0	0	617
73	46	3	470,00	0	0	0	3	4	12	4	0	0	628
74	44	3	337,75	3	4	12	3	4	12	4	0	0	629
75	71	2	14,92	3	4	12	3	3	9	4	0	0	631
76	56	3	244,33	3	4	12	3	4	12	4	0	0	632
77	60	3	62,25	3	3	9	0	0	0	0	0	0	633
78	53	3	42,42	3	4	12	3	4	12	4	0	0	635
79	60	3	414,25	3	4	12	3	4	12	4	0	0	638
80	54	3	55,58	2	4	8	3	4	12	4	0	0	640
81	74	3	135,42	3	4	12	2	2	4	4	0	0	643
82	51	3	345,08	3	4	12	3	4	12	4	0	0	646
83	70	3	144,00	3	4	12	0	0	0	0	0	0	647
84	65	3	53,92	0	0	0	2	3	6	3	0	0	648
85	71	3	144,50	0	0	0	2	3	6	2	0	0	659
86	61	3	18,67	1	1	1	2	2	4	2	0	1	665
87	69	3	31,33	3	4	12	3	4	12	4	0	0	666
88	45	3	60,83	0	0	0	2	4	8	3	0	0	669
89	50	1	131,33	2	4	8	3	4	12	4	0	0	676
90	64	3	80,08	0	0	0	2	2	4	2	0	0	677
91	83	3	0,00	2	1	2	3	3	9	3	0	0	678
92	51	1	252,25	3	4	12	3	4	12	4	0	0	679
93	70	3	292,25	3	4	12	3	4	12	4	0	0	680
94	78	3	8,92	1	2	2	3	4	12	4	0	0	681
95	58	3	220,50	0	0	0	2	2	4	2	0	0	682
96	68	3	111,17	3	4	12	3	4	12	4	0	0	683
97	70	3	68,92	1	3	3	3	4	12	4	0	0	684
98	69	3	86,08	2	2	4	3	4	12	4	0	0	686
99	66	3	0,00	3	4	12	3	4	12	4	0	0	689
100	64	3	15,58	3	3	9	2	3	6	3	0	0	690

Ergebnisse

101	61	3	60,75	0	0	0	3	4	12	4	0	0	691
102	61	4	286,08	2	1	2	2	3	6	3	0	0	692
103	71	3	52,67	3	4	12	3	4	12	4	0	0	693
104	67	3	37,58	0	0	0	3	4	12	4	0	0	694
105	55	3	64,58	3	4	12	3	4	12	4	0	0	695
106	47	3	57,67	0	0	0	2	2	4	2	0	0	697
107	60	2	301,92	2	3	6	2	3	6	2	0	0	702
108	58	3	0,92	0	0	0	3	4	12	4	0	0	704
109	68	2	0,25	0	0	0	2	3	6	3	0	0	705
110	53	3	137,50	3	1	3	3	4	12	4	0	0	706
111	62	3	90,33	1	1	1	3	4	12	4	0	0	708
112	45	4	157,08	2	1	2	2	3	6	3	2	0	709
113	62	3	3,00	3	4	12	3	4	12	4	0	0	710
114	79	3	88,25	3	4	12	3	4	12	4	0	0	712
115	78	1	71,58	3	4	12	2	3	6	3	0	0	722
116	53	3	42,08	1	2	2	3	3	9	3	0	0	723
117	63	3	106,08	0	0	0	3	4	12	4	0	0	725
118	56	3	3,42	3	4	12	3	4	12	4	0	0	727
119	77	3	32,33	0	0	0	2	4	8	4	0	0	730
120	73	2	55,58	3	4	12	3	4	12	4	0	0	731
121	64	3	45,92	2	4	8	3	4	12	4	0	0	732
122	87	2	63,50	3	4	12	3	4	12	4	0	0	733
123	73	3	41,92	0	0	0	3	4	12	4	0	0	735
124	61	3	41,67	3	4	12	3	4	12	4	0	0	737
125	75	1	2,00	3	4	12	3	4	12	4	0	0	739
126	65	2	142,00	1	4	4	3	4	12	4	0	0	742
127	58	3	173,42	3	4	12	3	4	12	4	0	0	745
128	67	3	0,83	3	4	12	3	4	12	4	0	0	746
129	57	3	27,33	2	3	6	1	1	1	1	0	0	747
130	64	3	0,67	0	0	0	2	3	6	3	0	0	748
131	73	3	404,50	1	1	1	2	3	6	3	1	0	750
132	62	3	132,92	2	1	2	3	4	12	4	0	0	751
133	57	3	16,75	3	4	12	3	4	12	4	0	0	752
134	73	3	20,00	2	3	6	2	2	4	2	0	0	753
135	69	3	97,25	3	4	12	3	4	12	4	0	0	754

Ergebnisse

136	76	3	31,00	3	4	12	3	4	12	4	0	0	755
137	50	3	1,67	0	0	0	3	4	12	4	0	0	756
138	69	2	82,42	3	3	9	3	3	9	3	0	0	757
139	60	3	35,08	2	4	8	3	4	12	4	0	0	758
140	54	3	45,00	3	4	12	3	4	12	4	0	0	761
141	59	3	103,33	1	1	1	3	4	12	4	0	0	762
142	67	3	256,50	1	1	1	3	3	9	4	0	0	763
143	56	3	118,00	0	0	0	3	4	12	4	0	0	764
144	74	2	29,75	1	1	1	3	4	12	4	0	0	765
145	69	3	131,92	3	3	9	3	4	12	4	0	0	770
146	72	2	35,83	3	3	9	2	1	2	1	0	0	780
147	45	3	58,75	3	3	9	3	3	9	3	0	0	781
148	67	2	109,08	3	4	12	3	4	12	4	0	0	782
149	46	3	464,75	3	4	12	3	1	3	1	0	0	783
150	72	3	14,42	1	1	1	2	3	6	2	0	0	786
151	77	3	13,58	1	1	1	1	1	1	1	0	0	788
152	10	3	7,50	2	3	6	3	4	12	4	0	0	798

Legende:

<u>Alter bei Diagnose:</u>	in Jahren
<u>FIGO-Stadium:</u>	Stadium I bis IV
<u>Überlebenszeit:</u>	in Monaten
<u>p53 Intens.:</u>	Färbeintensität IHC: 1= schwach, 2= mittelstark, 3= stark
<u>p53 Proz.:</u>	Prozent gefärbte Zellen in IHC: 0= negativ, 1=1-10%, 2= 11-50%, 3= 51-80%, 4= 81-100%
<u>p53 IRS:</u>	Immunreaktiver Score
<u>p16 Proz.:</u>	wie p53
<u>p16 Intens.:</u>	wie p53
<u>p16 IRS:</u>	wie p53
<u>p16 Kerne:</u>	Prozentzahl angefärbter Kerne in p16 IHC
<u>KRAS Mutation:</u>	0= keine Mutation, 1= c.35G>A p.G12D (Aspartat) 2= c.35G>T p.G12V (Valin)
<u>BRAF Mutation:</u>	0= keine Mutation, 1= c.1799T<A p.V600E (Valin)

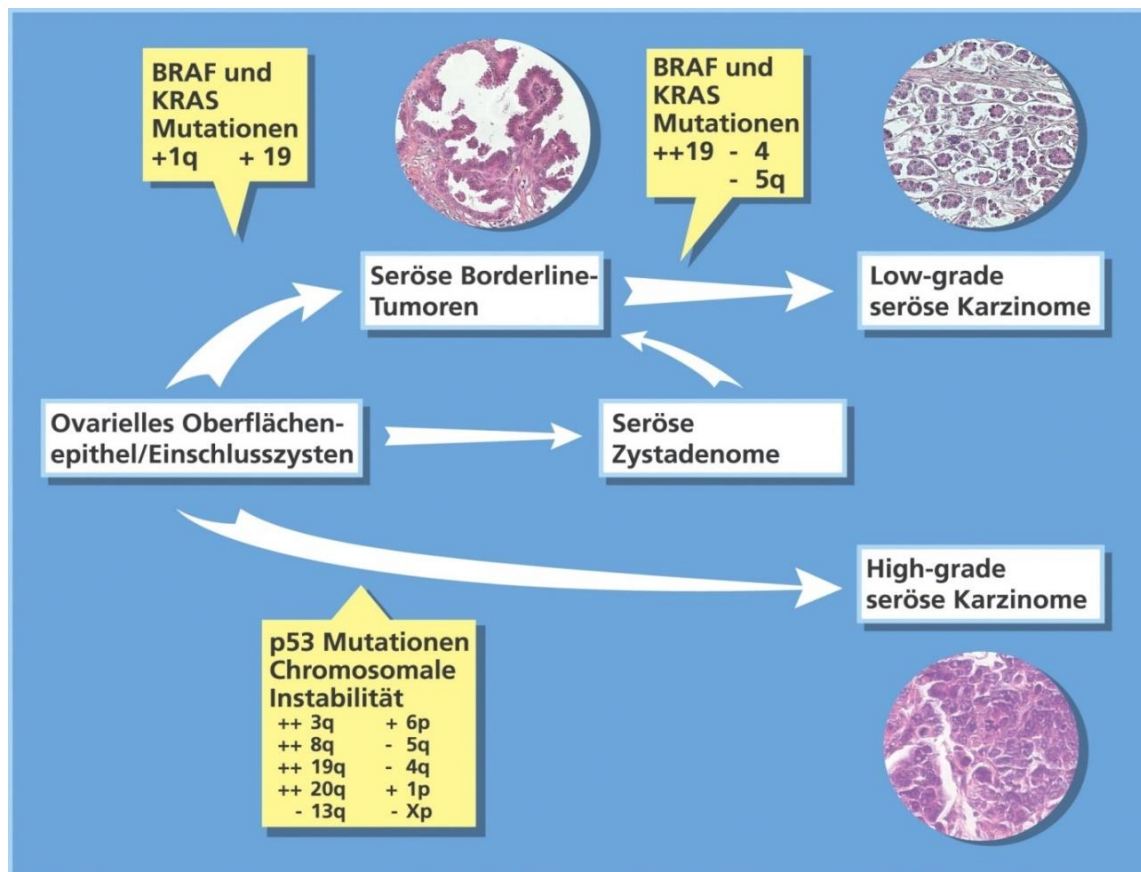
5 Diskussion

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste gynäkologische Malignom in Deutschland nach dem Endometrium- und dem Zervixkarzinom. Jedoch nimmt es den ersten Platz in der Todesstatistik der gynäkologischen Malignome ein. Dies wird vor allem verursacht durch eine späte Diagnosestellung in Stadium III oder IV, bedingt durch das Fehlen valider Früherkennungsmethoden sowie durch das aggressive Wachstums- und Metastasierungsverhalten des malignen Ovarialkarzinoms. Es fehlt zudem bislang eine targetorientierte beziehungsweise individuelle Therapie. Die etablierte Standardtherapie, bestehend aus einer radikalen Operation in Verbindung mit einer Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel wird für alle Unterarten des Ovarialkarzinoms gleichermaßen angewandt. Die verschiedenen Subtypen unterscheiden sich jedoch sowohl in ihren Entstehungswegen als auch in ihrem Wachstums- und Metastasierungsverhalten stark voneinander.

Im Jahr 2004 wurde von Malpica et al. postuliert, dass sich das seröse Ovarialkarzinom histologisch nach einem Zwei-Stufen-System graduieren lässt (Malpica et al., 2004), ein HGSC und ein LGSC (s. Einleitung). Diese These wurde auch durch die deutlich längere Überlebenszeit von Patientinnen mit einem LGSC im Vergleich zu einem HGSC gestützt (Bodurka et al., 2012), (M. Chen et al., 2014). Aus diesen Erkenntnissen und zahlreichen molekulargenetischen Untersuchungen hat sich die Theorie der dualen Tumorgenese entwickelt:

Diese Theorie gilt ausschließlich für den häufigsten Subtyp der serösen epithelialen Ovarialkarzinome und besagt, dass es zwei Entitäten mit unterschiedlichen genetischen Entstehungswegen gibt, das LGSC (Typ I) und das HGSC (Typ II). Typ I Karzinome entstehen schrittweise aus epithelialen Einschlusszysten, die sich über einen Borderline- Tumor schließlich zu einem Low Grade- Karzinom entwickeln. Dieser Weg entsteht charakteristischerweise durch das Auftreten von KRAS- und BRAF- Mutationen (Mayr et al., 2006). Das Typ II Karzinom entsteht de novo und ist durch TP53- und TP16- Mutationen charakterisiert (Stäbler & Diebold, 2005). Zur Veranschaulichung soll das Schaubild von Diebold und Stäbler dienen:

Abbildung 28: Entstehungswege des LGSC und HGSC (Stäbler & Diebold, 2005)



Das LGSC und das HGSC sind demnach zwei unterschiedliche Entitäten, die sich bezüglich ihrer klinischen Prognose, ihrer Histologie und ihrer genetischen Entstehungswege unterscheiden.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen ist es, dieses Modell der dualen Tumorgenese an einem großen Kollektiv von serösen Ovarialkarzinomen zu überprüfen. Dabei wurden 185 Karzinome regraduiert und in High grade und Low grade unterteilt. Es ergaben sich 33 Low Grade- und 152 High Grade- Karzinome. Die 33 LGSC wurden von Hartmann et al. darauf untersucht, ob die Zwei-Stufen-Graduierung nach Malpica aussagekräftig und reproduzierbar ist. Zudem wurden die 33 LGSC auf Mutationen der Gene TP53 sowie KRAS und BRAF untersucht (Hartmann & Mayr et al., 2015). Die 152 HGSC wurden in der vorliegenden Arbeit auf Mutationen der Gene TP53, TP16, KRAS und BRAF untersucht.

Bei den Mutationsuntersuchungen von TP16 zeigten sich folgende Ergebnisse: Bei 87 Karzinomen (57%) zeigte sich eine p16- Überexpression. In einer Studie aus dem Jahr 2013 wurden 582 HGSC sowie 45 LGSC und 49 seröse Borderline-

Tumoren nach den neuen, im Jahr 2014 in die WHO aufgenommenen Kriterien auf TP53 und CDKN2A (Das Gen, das unter anderem für p16 kodiert), hin untersucht. Es sollte der Wert dieser Marker zur Unterscheidung von HGSC und LGSC überprüft werden. Es zeigte sich unter anderem, dass der Anteil an Fällen, die als p16-positiv zu werten sind, in etwa zwischen 55% und 72% liegt (Altman et al., 2013). Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen von etwa 57%. Die p16-Mutation kann also als ein Kriterium zur Unterscheidung von High grade und Low grade dienen. Es lassen sich jedoch nicht alle HGSC mit einer p16- Mutation in Verbindung bringen, wodurch die Aussagekraft eingeschränkt bleibt (O'Neill et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigten 85% der HGSC eine p53-Mutation. Dies deckt sich mit Angaben in der Literatur, die besagen, dass ein Großteil der HGSC p53-mutiert ist (Rechsteiner et al., 2013), (Vereczkey et al., 2011) und dass dies eines der wichtigsten Ereignisse zur Entwicklung eines aggressiven Karzinoms darstellt (Ayhan et al., 2009), (Koshiyama et al., 2014), (O'Neill et al., 2005), (Bodurka et al., 2012). Die 15% Karzinome, die keine Mutation aufweisen, finden sich mit wechselnder Häufigkeit auch in der Literatur wieder. Die Tatsache, dass nicht 100% der High grade- Karzinome eine p53- Mutation tragen, hängt mit der hohen genetischen Instabilität zusammen, die das Ovarialkarzinom kennzeichnet (Bast, Hennessy, & Mills, 2009). Durch diese genetische Instabilität ist die Wahrscheinlichkeit für weitere Genmutationen deutlich erhöht. So könnte sich erklären lassen, dass auch High grade Karzinome ohne eine p53- Mutation entstehen können, wenn andere Schlüsselgene für die Zellteilung betroffen sind. Eines dieser Gene ist CDK12, denn eine Mutation führt zum Verlust zahlreicher Reparaturmechanismen, was zu einer genomischen Instabilität führt, die den Weg für weitere Mutationen öffnet (Ekumi et al., 2015). Diese genetische Instabilität führt auch zur Chemoresistenz und erhöht das Risiko eines Rezidivs (Zhang et al., 2017).

Es steht fest, dass die große Mehrheit der HGSC eine p53-Mutation trägt und dass dies ein wichtiges, frühes Ereignis in der Genese der aggressiven HGSC darstellt. Es wurde nachgewiesen, dass eine Mutation in TP53 die EMT (Epithelial - Mesenchymale Transition, das heißt die Lösung des Epithels aus dem Zellverband) stark vorantreibt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Einwanderung maligner Zellen aus den STIC in das Ovar sein. Die EMT ermöglicht den Zellen des Epithels eines Organs, sich aus ihrem Zellverband zu lösen und stellt somit ein

wichtiges Moment in der Entwicklung von malignen Metastasen dar. In Stammzellen der Mamma wurde nachgewiesen, dass eine p53-Mutation das EMT-Programm aktiviert und dadurch auch mit einem hohen Tumorgrad in Brustkrebszellen korreliert (C. J. Chang et al., 2011). Man kann bei p53 also zum einen von einem „Wächter des Genoms“ sprechen, zum anderen aber auch von einem „Wächter des Epithels“. Die Theorie, die die distale Tube als Ursprungsort des Ovarialkarzinoms vermutet, gilt bislang jedoch nur für die BRCA- positiven Karzinome als gesichert (Kindelberger et al., 2007), (Meinhold-Heerlein et al., 2016).

In einer anderen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine mutierte p53-Expression in Zellen der distalen Tube die Zellmigration entscheidend vorantreibt (Quartuccio et al., 2015). Dies zeigt, dass sich durch die p53-Mutation auf diese Weise Zellen eines tubaren STIC aus dem Zellverband lösen und in das Ovar metastasieren könnten. Die Autoren legen nahe, dass die p53-Mutation entscheidend für die Entstehung des HGSC aus entarteten Zellen der Tube ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass HGSC, die keine p53-Mutation tragen, eventuell einen anderen, noch unbekannten Ursprungsort haben.

In der Untersuchung der 33 LGSC des Kollektivs (Hartmann & Mayr et al., 2015) fand sich in 15% der Fälle eine p53-Mutation. Dagegen wurden lediglich in 18% der Fälle eine KRAS-Mutation und in nur einem Fall (3%) eine BRAF-Mutation nachgewiesen. In 64% der Fälle fand sich weder eine KRAS/BRAF- noch eine p53-Mutation. Diese Ergebnisse heben sich deutlich von der Theorie der dualen Tumorgenese ab. Diese besagt, dass die Entstehung der LGSC durch eine KRAS-Mutation gekennzeichnet ist. Während dies für gut differenzierte Low grade-Tumoren zu gelten scheint (Singer et al., 2003), zeigt sich bei LGSC in fortgeschrittenem Stadium mit einer Tendenz zur Metastasierung ein anderes Bild. In einer Untersuchung aus dem Jahr 2010 zeigte ein Kollektiv von fortgeschrittenen LGSC eine niedrige Rate an KRAS- und BRAF-Mutationen. Die Autoren schlossen daraus, dass LGSC ohne BRAF-Mutationen ein höheres Potential haben könnten, sich zu HGSC zu entwickeln (Wong et al., 2010). Auch einige Fallstudien deuten in diese Richtung (Boyd & McCluggage, 2012), (Quddus, Rashid, Hansen, Sung, & Lawrence, 2009), (Parker, Clement, Chervcover, Sornarajah, & Gilks, 2004).

Für die These der Entwicklung von HGSC aus Borderline- Tumoren oder LGSC spricht zusätzlich, dass knapp 5% der HGSC eine KRAS- oder BRAF- Mutation

aufwiesen:

In 4/6 KRAS-mutierten Fällen zeigte sich zugleich eine p53-Mutation. In 3/6 Fällen ließ sich eine p16-Mutation nachweisen und 2/6 Karzinomen trugen sowohl eine p53- als auch eine p16-Mutation. Der eine Fall, der BRAF-mutiert ist, trägt zusätzlich eine p53- Mutation, aber keine p16-Mutation. Dies könnte bedeuten, dass die ursprünglichen LGSC durch eine später erworbene p53- oder p16-Mutation eine Progression zu einem HGSC erfahren haben, was die oben genannte These umso plausibler erscheinen lässt.

In der überwiegenden Mehrheit der untersuchten Fälle folgen die Karzinome jedoch einem getrennten Entstehungsweg (Dehari et al., 2007), was mit dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

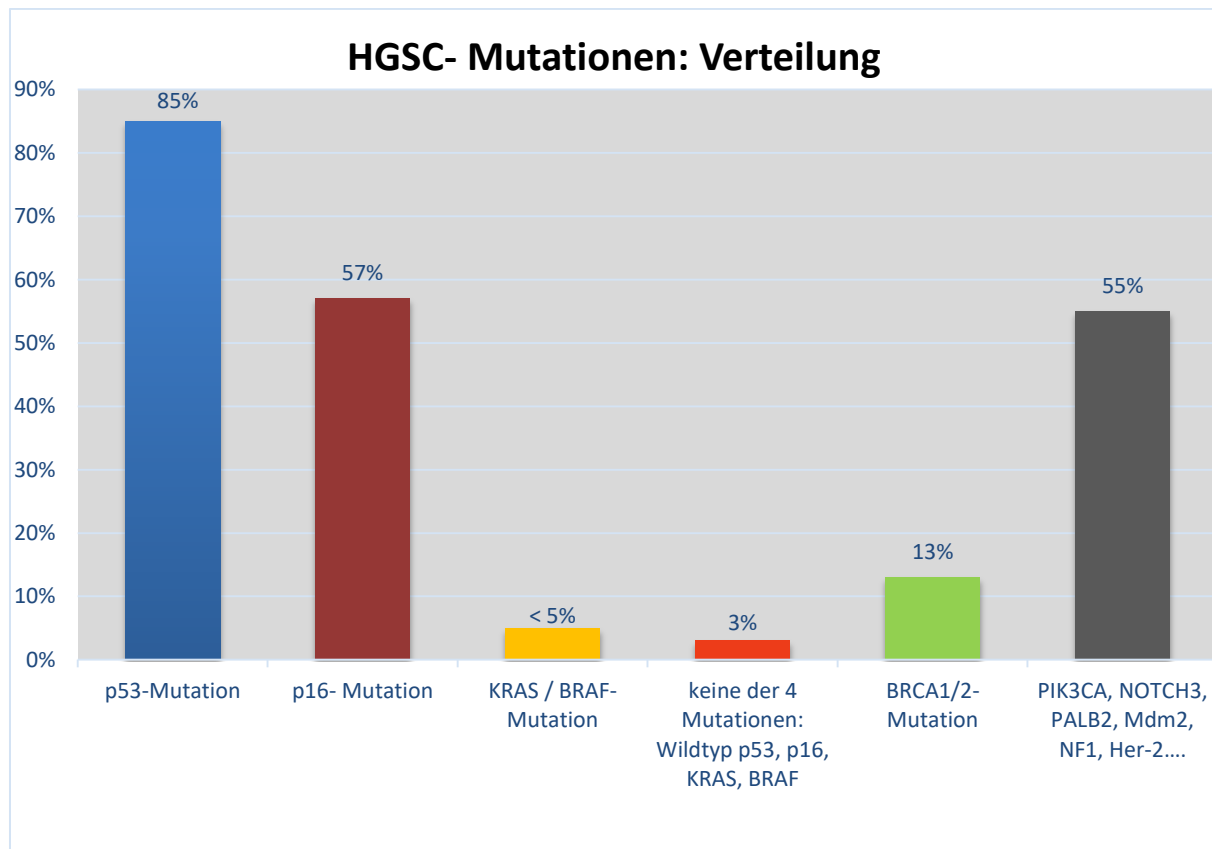
Nur einer der sechs Fälle trug ausschließlich eine KRAS-Mutation.

Diejenigen Karzinome, die in dieser Arbeit p53-negativ (15%) oder p16-negativ (23%) waren, müssen, um sich zu einem HGSC entwickeln zu können somit andere, unbekannte Mutationen tragen, deren Identifizierung in dieser Arbeit nicht möglich war. In 5 Fällen (3,3%) (Archivnummern #386, #442, #692, #702, #753) lag keine einzige der 4 untersuchten Mutationen vor. Der Ursprung dieser Karzinome scheint fernab der Theorie der dualen Tumorgenese zu liegen (s. Schaubild unten).

In diesem Zusammenhang sind viele weitere Gene Gegenstand der Forschung. Einige dieser Gene wurden in Untersuchungen bereits nachgewiesen. In einer Studie am Mausmodell zeigte sich, dass neben p53 auch PIK3CA eine Progression zum HGSC begünstigen kann (R. Wu et al., 2013).

Im Folgenden ist die Verteilung der Genmutationen der 152 untersuchten HGSC dargestellt (unter der Annahme, dass die Überexpression in der Immunhistochemie einer Mutation entspricht, [siehe unten]). Zudem wurden mittels Literaturrecherche andere Genmutationen ergänzt, die beim HGSC ebenfalls vorkommen können, mit oder ohne zusätzliche p53- oder p16- Mutation:

Abbildung 29: Verteilung der verschiedenen Mutationen beim serösen ovariellen High Grade- Karzinom (HGSC). Ergänzt durch weitere Mutationen gemäß Literaturrecherche.



Eine Mutation mit BRCA 1 oder BRCA 2 findet sich bei ca. 13% aller HGSC (The Cancer Genome Atlas TCGA, 2011), (Pal et al., 2005), (Risch et al., 2006).

Gene wie Mdm2, PIK3CA, NOTCH3, AKT2, RSF1, NF1, CDK12, RB,1 FAT3, HER-2 und PALB2 finden sich beim HGSC laut Studien mit verschiedenen Häufigkeiten zwischen 10% und 55% (The Cancer Genome Atlas TCGA, 2011), (Cho & Shih le, 2009), (English, Roque, & Santin, 2013), (Milea et al., 2014), (Ekumi et al., 2015; Nakayama et al., 2006).

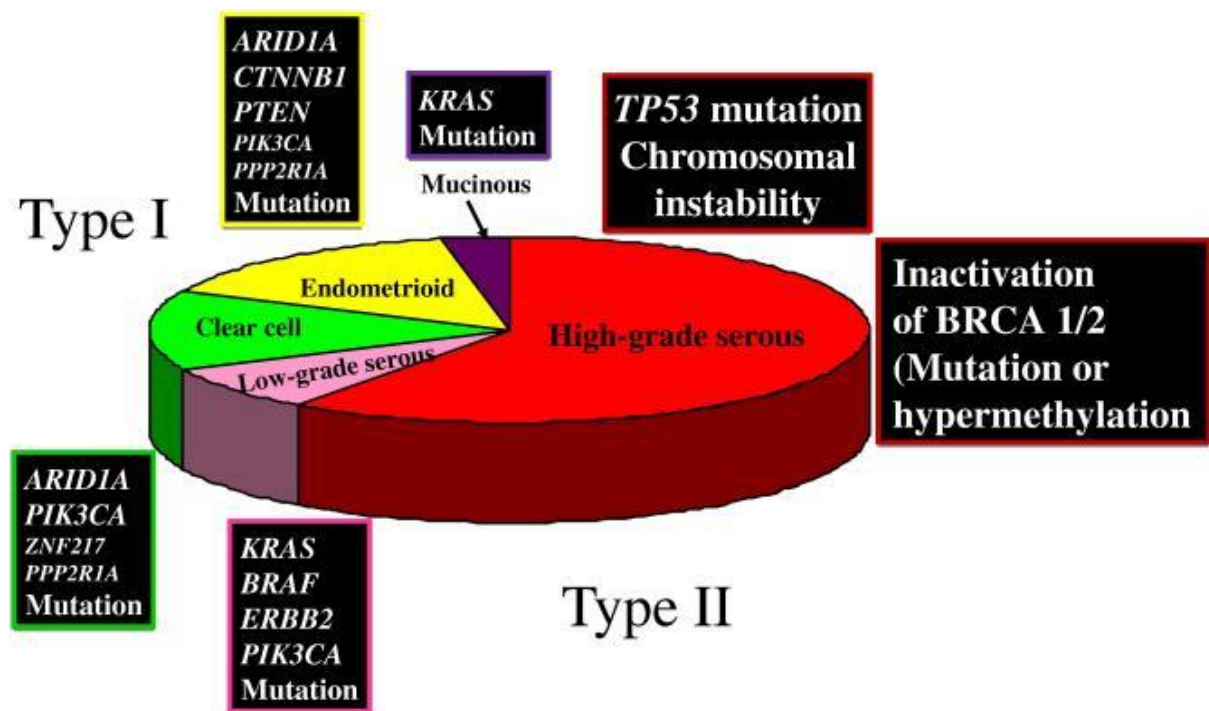
Für die 15% der Karzinome ohne p53- Mutation muss auf jeden Fall gelten, dass sie andere Genmutationen aufweisen, die zu der malignen Entartung geführt haben. In der vorliegenden Arbeit konnte das Verhältnis dieser Genmutationen zur p53- Mutation bzw. zur p16- Mutation nicht geklärt werden kann. Wie die Verteilung all dieser Gene zueinander ist, muss in anderen, weiter gefassten Mutationsanalysen geklärt werden.

Wie beim serösen Typ gezeigt, gibt es natürlich auch bei allen anderen histologischen Typen des Ovarialkarzinoms verschiedene zugrundeliegende

Genmutationen, die je nach Typ zum Teil charakteristisch sind.

Im folgenden Schaubild wird eine Übersicht über die verschiedenen histologischen Unterarten des epithelialen Ovarialkarzinoms und assoziierte Genmutationen gegeben.

Abbildung 30: Prävalenz der histologischen Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms und assoziierte potentielle Genmutationen (Kurman & Shih 1e, 2011)



So verschieden die Genmutationen sind, so verschieden sind die Eigenschaften der Karzinome und damit auch die Symptome, das Ansprechen auf die Therapie sowie die Prognose. Dies macht deutlich, wie divers die Ovarialkarzinome sind und wie wichtig eine genauere Kenntnis der molekularen Entstehungswege ist, um die einzelnen Karzinome adäquat und wirkungsvoll therapieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit wird mit der Untersuchung der serösen Ovarialkarzinome die größte Untergruppe der Ovarialtumoren abgedeckt, jedoch naturgemäß nicht alle. Auch die Fokussierung auf die vier untersuchten Gene TP53, TP16, KRAS und BRAF liefert kein vollständiges Bild der genetischen Entstehungsmechanismen. Diese sind weitaus komplexer und umfassen eine wesentlich größere Anzahl mutierter Gene.

Die immunhistochemische Auswertung stellt eine semiquantitative Untersuchung dar, deren Qualität abhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist. Jedoch sind im Institut sämtliche angewandte Methoden wie die PCR, die IHC-Färbung und deren

Auswertung sehr gut etabliert und werden regelmäßig angewandt, sodass hier keine Fehler zu erwarten sind. Gleiches gilt für die Pyrosequenzierung.

In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass die p53- Überexpression gut mit der TP53-Mutation korreliert. Dies findet sich auch in der Literatur wieder: (Kmet et al., 2003), (Kohler et al., 1992), (Marks et al., 1991).

Auch gemäß der WHO-Einteilung von 2014 gilt sowohl eine starke Expression in >60% der Zellen als auch das völlige Fehlen einer Expression als p53- Mutation. In einer jüngeren Studie konnte gezeigt werden, dass die Trefferquote unter diesen Kriterien bei etwa 94% liegt (Yemelyanova et al., 2011).

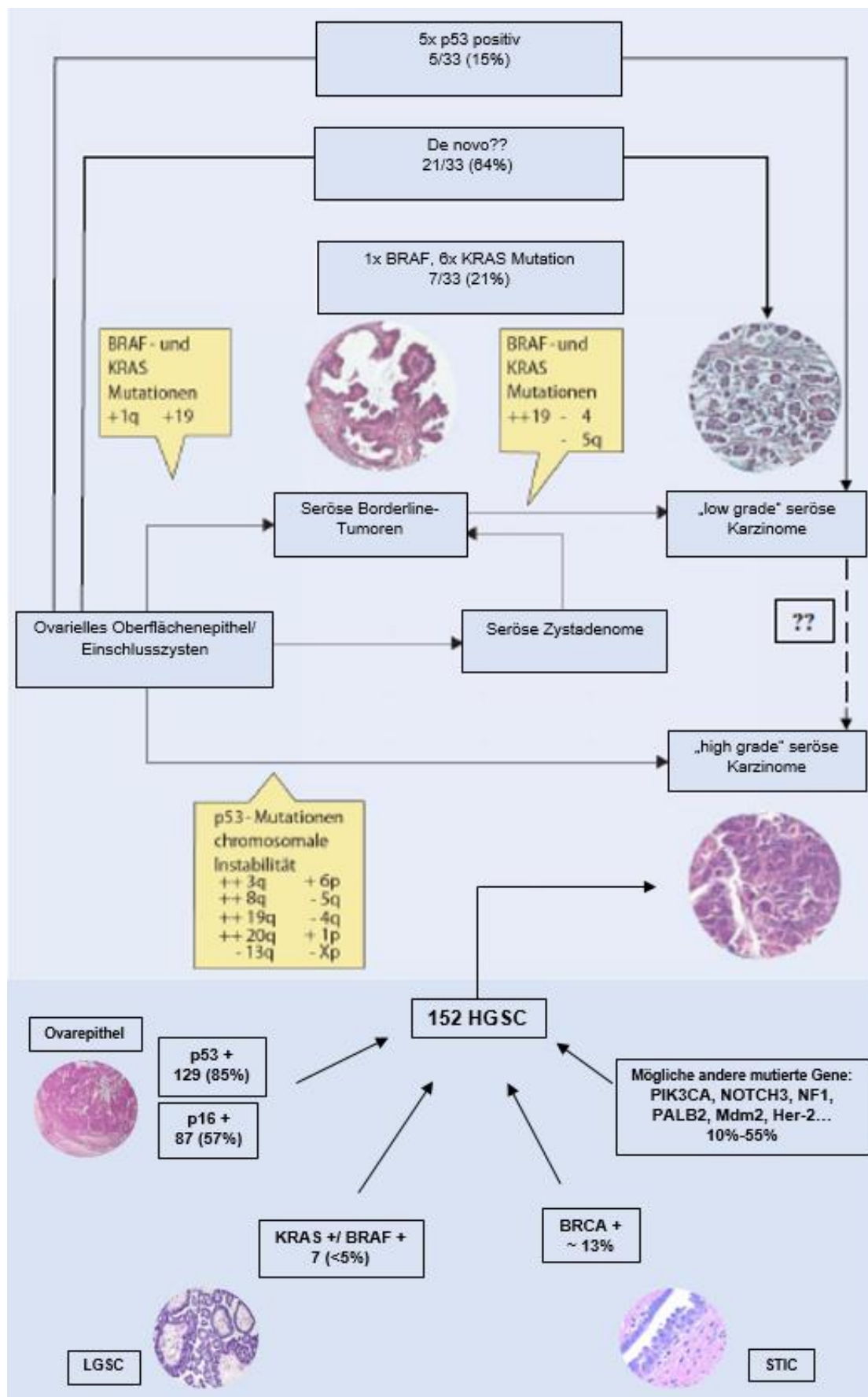
Sämtliche verwendete Proben wurden in der Arbeitsgruppe einzeln überprüft und gemäß der Definition der neuen WHO 2014 als High grade oder Low grade eingeteilt. Somit kann es als sicher angesehen werden, dass auch diejenigen untersuchten Fälle High grade sind, die keine passende Mutation zur Theorie der dualen Tumorgenese aufweisen.

Abschließend lässt sich bestätigen, dass die Theorie der dualen Tumorgenese für seröse Tumoren des Ovars ein unvollständiges Modell darstellt.

Ein Teil der HGSC scheint aus LGSC bzw. Borderline- Tumoren zu entstehen, ein weiterer Teil tritt familiär gehäuft auf und ist mit einer BRCA1/ BRCA2- oder auch einer Rad51c- Mutation verbunden. Es ist unstrittig, dass die p53- und die p16- Mutation eine wichtige Rolle für die Entstehung des HGSC spielen. Ein Teil weist jedoch keine der beiden Mutationen auf, einige Karzinome sogar keine einzige der 4 untersuchten Mutationen. Diese Fälle müssen somit einem gänzlich anderen Entstehungsweg außerhalb der dualen Theorie folgen.

Eine weitere Interpretation ist in der folgenden Skizze dargestellt:

Abbildung 31: Theorie der dualen Tumorgenese, modifiziert nach (Hartmann & Mayr et al., 2015)



Der Nachweis verschiedener weiterer Genmutationen in serösen Ovarialkarzinomen wie etwa Mdm2, PIK3CA, NOTCH3, NF1 und anderer mehr zeigt, dass die Entstehung des serösen Ovarialkarzinoms komplexer ist, als es die duale Theorie abbilden kann. Es bedarf aufwändiger molekularer Untersuchungen, um die noch unbekannten Entstehungswege nachzuvollziehen.

Die Mutationsanalysen der Ovarialkarzinome sind neben der Diagnostik (genetische Einteilung und Unterstützung der histopathologischen Graduierung) vor allem auch therapeutisch von hoher Bedeutung. Im Idealfall wird so ermöglicht, für jede Patientin eine an ihr jeweiliges Karzinom individuell angepasste Therapie anzubieten. In Betracht kommen dabei zielgerichtete Therapien, die beispielsweise direkt mit mutierten Wachstumsrezeptoren an der Oberfläche interagieren. Eine andere Möglichkeit stellen Wirkstoffe dar, die einen Zwischenschritt in solchen mutierten Pathways blockieren, die für die Zellproliferation zuständig sind.

Ein erstes Beispiel hierfür ist der PARP-Inhibitor Olaparib, der in einer Phase-II-Studie aus dem Jahr 2014 das progressionsfreie Überleben einer speziellen Untergruppe von Patientinnen mit Platin-sensiblen, BRCA-positivem Rezidiv eines HGSC signifikant verlängern konnte (Ledermann et al., 2014). Da Mutationen in BRCA, Rad51c und PALB2 die Dysfunktion der homologen Rekombination zur Folge haben und somit ein Ansprechen auf PARP-Inhibitoren ermöglichen, könnten sie in Zukunft als Prädiktoren für einen Therapieerfolg fester Bestandteil der Diagnostik werden (Kohn & Ivy, 2017), (Cunningham et al., 2014).

Es wird weiterhin daran geforscht ein Profil der genomischen Instabilität, die im HGSC neben der p53-Mutation zu zahlreichen Genmutationen führen kann, zu ermitteln. Wenn ein solches Profil vorliegt, könnten sich damit in Zukunft Aussagen über das klinische Ansprechen auf bestimmte zielgerichtete Medikamente und den Therapieerfolg treffen lassen (Wang et al., 2012).

Diese Überlegungen und Erfolge machen die große Bedeutung der zielgerichteten Therapien deutlich und zeigen auf, wie wichtig in Zukunft die immer genauere Erforschung der verschiedenen genetischen Entstehungsmechanismen für die Diagnostik und Therapie der Ovarialkarzinome sein wird.

6 Zusammenfassung

Das Ovarialkarzinom ist das dritthäufigste gynäkologische Malignom in Deutschland nach dem Endometrium- und dem Zervixkarzinom. Es zählt trotz jahrzehntelanger Forschungsarbeit noch heute zu den tödlichsten Krebsarten überhaupt. Das Überleben hat sich in den letzten 40 Jahren kaum verbessert. Für alle Ovarialkarzinome wird grundsätzlich dieselbe Chemotherapie angeboten, die die Prognose jedoch bislang nicht eindeutig verbessern konnte. Entscheidend für die Prognose bleibt die primäre Operation. Um eine effektivere Therapie entwickeln zu können, müssen die molekulargenetischen Grundlagen besser verstanden werden. Ein erster Schritt hierzu ist in der Zwischenzeit die gültige duale Entstehungstheorie des serösen Karzinoms.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Theorie der dualen Tumorgenese des serösen epithelialen Ovarialkarzinoms zu überprüfen. Diese Theorie besagt, dass das seröse Typ-I-Karzinom (LGSC) schrittweise über eine Adenom-Borderline-Karzinom-Sequenz entsteht und durch KRAS und BRAF- Mutationen gekennzeichnet ist. Das seröse Typ-II-Karzinom (High Grade) dagegen entsteht de-novo und es finden sich typischerweise TP53- und TP16-Mutationen. Zur Überprüfung wurden Gewebeproben von 185 Patientinnen mit HGSC und LGSC auf Mutationen untersucht. Die 152 HGSC wurden immunhistochemisch auf TP53 und TP16 untersucht, KRAS und BRAF mittels Pyrosequenzierung. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der Untersuchung von 33 LGSC aus demselben Kollektiv verglichen, die von Hartmann et al untersucht worden waren. Von den 152 HGSC trugen insgesamt 85% eine p53-Mutation, in 15% der Fälle fand sich keine Mutation. Bei der Untersuchung der p16-Mutation fand sich in 57% der Fälle eine Mutation, 43% wiesen keine Mutation auf. In 6 Fällen konnte eine KRAS-Mutation nachgewiesen werden. In einem Fall fand sich eine BRAF-Mutation. Bei der Untersuchung der 33 LGSC durch Hartmann et al. fand sich in 15% der Fälle eine p53-Mutation. In 18% fand sich eine KRAS-Mutation und in 3% eine BRAF-Mutation.

Die p53-Mutation ist ohne Frage ein sehr wichtiges Ereignis in der Frühphase der meisten HGSC. 15% der HGSC entwickelten sich jedoch ohne eine p53-Mutation. Zudem wiesen 43% keine p16- Mutation auf. Sie müssen anderen Mutationswegen folgen. In 4,6% fand sich eine KRAS- oder BRAF-Mutation, alle bis auf ein Fall hatten

zusätzlich eine p53-Mutation erworben. Dies lässt die Vermutung zu, dass sie eine Progression von LGSC zu HGSC durchlaufen haben. In 5 HGSC fand sich keine der 4 untersuchten Gene. Diese Fälle müssen daher gänzlich anderen, noch unbekannten Entstehungswegen folgen, die unabhängig von der Theorie der dualen Tumorgenese sind.

Bei den LGSC zeigten sich ebenfalls sehr deutliche Abweichungen von der dualen Genesetheorie. Da nur 18% eine KRAS/BRAF-Mutation zeigten, wird infrage gestellt, ob diese Mutation für die Entwicklung von LGSC aus Einschlusszysten und Borderline-Tumoren obligat ist. Zudem trugen 15% der LGSC eine p53-Mutation. Diese Fälle trugen also die typische HGSC-Mutation, ohne jedoch die histologischen High grade – Kriterien zu erfüllen. 64% der LGSC zeigten weder eine KRAS/BRAF- noch eine p53-Mutation. Auch diese Fälle scheinen wie einige Fälle der HGSC durch weitere Mutationen außerhalb der Theorie der dualen Tumorgenese entstanden zu sein.

Der Nachweis verschiedener weiterer Genmutationen in serösen Ovarialkarzinomen wie etwa Mdm2, PIK3CA, NOTCH3, NF1 und anderer mehr zeigt, dass die Entstehung des serösen Ovarialkarzinoms wesentlich komplexer ist, als es die duale Theorie abbilden kann. Ein Teil der Karzinome weist zudem Keimbahnmutationen in BRCA1/2 oder in Rad51c auf und tritt familiär gehäuft auf.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Theorie der dualen kein vollständiges Modell darstellt, sondern vielmehr um weitere Wege der Tumorentstehung ergänzt werden muss, um zielgerichtete Therapien zu ermöglichen.

Ein erstes Beispiel hierfür ist der im Jahr 2014 zugelassene PARP-Inhibitor Olaparib, der in einer Phase-II-Studie das progressionsfreie Überleben von Platin-sensiblen, BRCA-positiven HGSC-Rezidiven signifikant verlängern konnte. Durch komplexe molekulargenetische Untersuchungen könnte für jedes Karzinom in Zukunft ein individuelles Mutationsprofil erstellt werden. So könnte sich beispielsweise feststellen lassen, ob eine Dysfunktion in der homologen Rekombination (HRD- Phänotyp) vorliegt, die mit Mutationen in BRCA1/2, Rad51c oder PALB2 verbunden ist und damit eine Aussage über den Therapieerfolg mit Olaparib erlaubt (Cunningham et al., 2014).

Diese Überlegungen machen deutlich, wie wichtig in Zukunft die immer genauere Erforschung der molekularen Entstehungsmechanismen für die Diagnostik und Therapie der Ovarialkarzinome sein wird.

7 Anhang

7.1 Danksagung:

Bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Kirchner bedanke ich mich dafür, dass ich diese Arbeit unter seiner Institutsleitung durchführen konnte.

Ich möchte mich in besonderem Maße bei Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr bedanken für ihre stetige Hilfe und Anleitung von den ersten Grundsatzüberlegungen bis hin zur fertigen Arbeit. Sie war jederzeit ansprechbar und nahm sich Zeit für alle Fragen und Herausforderungen.

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Jung bedanke ich mich für die Beratung und Unterstützung beim molekulopathologischen Teil dieser Arbeit. Er war eine große Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit sowohl was die theoretischen Hintergründe als auch was die praktische Koordinierung der Laborarbeiten anbelangt.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei Frau Jutta Hügl-Tegge und Frau Gabriele Charell, die mich bei der Durchführung der praktischen Arbeiten im Labor enorm unterstützt haben.

Auch allen anderen Mitarbeitern des pathologischen Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, aber hier nicht genannt wurden, gilt mein Dank.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die immerwährende Unterstützung während dieser Arbeit und des gesamten Studiums.

7.2 Verzeichnisse

7.2.1 Geräte

Entwässerungsmaschine	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschl.
Rotations-Mikrotom HM 355S	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschl.
Microtome Blade N35	Feather Safety Razor Co Ltd., Osaka, Japan
HE-Färbung Tissue-Tek	Sakura Finetek GmbH Staufen, Deutschland
Lichtmikroskop Biomed	Leica, Wetzlar, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
QIAcube	Qiagen GmbH, Hilden Deutschland
Mastercycler Pro PCR vapo.protect	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gel-Elektrophorese	
Multi-Image II FC Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation,
Pyromark Q24 Sequenzierer	Qiagen, Hilden, Deutschland

7.2.2 Verbrauchsmaterialien

7.2.3 DNA-Isolation:

Xylol (Isomerengemisch reinst)	AppliChem GmbH, Darmstadt,
(Dimethylbenzene)	Deutschland
Ethanol absolute p.A.	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Skalpellklingen	neoLab, Heidelberg, Deutschland
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

7.2.4 Gel-Elektrophorese

SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Puffer	0,5-facher TBE-Puffer: TRIS, Borat, EDTA
Blaupuffer	DNA-loading dye, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DNA Low Range Ladder	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

7.2.5 Pyrosequenzierung

Binde-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland (10xBuffer)
Annealing Buffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Wasch-Puffer 10x	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Denaturation Solution	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pyro Gold Reagents	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAamp DNA Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sequenzierungs-Primer BRAF	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
Sequenzierungs-Primer KRAS	Metabion International AG, Martinsried, Deutschland
Streptavidin Sepharose™ High Performance, Beads	GE Healthcare, Uppsala, Schweden

7.2.6 Software

Gerätesoftware für die Methoden:

Gel-Fotos: AlphaEaseFC (FluorChem FC2)

QIAcube, PCR-Cycler: Pyromark Q24

Allgemeine Software: SPSS, Endnote, Microsoft Office

7.2.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2012 (Robert Koch-Institut, 2015)	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung von Low Grade-Ovarialtumoren (modifiziert). (Riede & Schaefer et. al., 2004).	16
Abbildung 3: Dualer Weg der Tumorgenese bei serösen Ovarialkarzinomen modifiziert nach Diebold (Stäbler & Diebold, 2005).	17
Abbildung 4: STIC-Zellen aus dem Bereich der tubaren Fimbrien „metastasieren“ auf die Oberfläche des Ovars. Schaubild nach Kurman et al (Kurman & Shih le, 2010). 18	
Abbildung 5: Übersicht über verschiedene mögliche Entstehungswege des HGSC und des LGSC	20
Abbildung 6: Regulation von p53 durch Mdm2 (Proctor and Gray, 2008).....	21
Abbildung 7: P53 und Rb und ihre Funktion im Zellzyklus (Offermanns S. and Rosenthal W., 2008).....	22
Abbildung 8: Regulation des Zellzyklus, p16/Rb-Pathway, adaptiert nach (Peurala, Koivunen, Haapasaari, Bloigu, & Jukkola-Vuorinen, 2013).	24
Abbildung 9: MAPK/ERK-Signalkaskade (Murcia et al., 2016).....	25
Abbildung 10: Übersicht über die histologische Herkunft der Ovarialtumoren	38
Abbildung 11: HGSC p53-starke IHC- Anfärbung IRS=12.....	44
Abbildung 12: HGSC p16–starke IHC-Anfärbung: IRS=12.....	44
Abbildung 13: HGSC p53- keine IHC-Anfärbung IRS= 0.....	45
Abbildung 14: HGSC p16 - keine IHC-Anfärbung IRS=0.....	45
Abbildung 15: Zugehöriger Leerschnitt, mit dem Skalpell ausgekratzt Tumormaterial	50
Abbildung 16: HE-Schnitt mit markiertem Tumorareal.....	50
Abbildung 17: QiaCube der Qiagen GmbH.....	51
Abbildung 18: Pyrosequenzierung Saugkopf.....	58
Abbildung 19: Pyrosequenzierung Waschstraße	58
Abbildung 20: HGSC p53 10x Vergrößerung.....	63
Abbildung 21: HGSC p16 20x Vergrößerung.....	64
Abbildung 22: LGSC p53 10x Vergrößerung	64
Abbildung 23: LGSC p16 10x Vergrößerung	65
Abbildung 24: KRAS-Mutation 1: c.35G>A -p.G12D (Aspartat).....	66
Abbildung 25: KRAS-Mutation 2: c.35G>T - p.G12V (Valin).....	66
Abbildung 26: KRAS Wildtyp Exon 2	66
Abbildung 27: BRAF Mutation: c.1799T<A p. V600E: „Austausch von Valin durch Glutaminsäure“ Mutation: GTG → GAG	68
Abbildung 28: Entstehungswege des LGSC und HGSC (Stäbler & Diebold, 2005) .	76
Abbildung 29: Verteilung der verschiedenen Mutationen beim serösen ovariellen High Grade- Karzinom (HGSC). Ergänzt durch weitere Mutationen gemäß Literaturrecherche.	80

Abbildung 30: Prävalenz der histologischen Subtypen des epithelialen Ovarialkarzinoms und assoziierte potentielle Genmutationen (Kurman & Shih le, 2011)	81
Abbildung 31: Theorie der dualen Tumorgenese, modifiziert nach (Stäbler & Diebold, 2005) (Hartmann & Mayr et al., 2015)	83

7.2.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Einteilung und FIGO-Klassifikation	32
Tabelle 2: Überlebensraten je nach FIGO-Stadium	37
Tabelle 3: Antikörper p53- Immunhistochemie	46
Tabelle 4: Antikörper p16-Immunhistochemie	46
Tabelle 5: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele (Remmele & Stegner, 1987)	47
Tabelle 6: p16-IHC-Färbung Kerne	47
Tabelle 7: PCR- Ansatz	53
Tabelle 8: PCR Amplifikationsprimer KRAS	53
Tabelle 9: PCR Amplifikationsprimer BRAF.....	53
Tabelle 10: PCR Sequenzierungsprimer KRAS.....	56
Tabelle 11: PCR Sequenzierungsprimer BRAF.....	56
Tabelle 12: Pipettieranleitung: Sepharose Beads-Mix und Primer-Mix.....	57
Tabelle 13: p53 nach dreistufigem Score anhand der Färbeintensität.....	61
Tabelle 14: p53 nach klassischem IRS.....	61
Tabelle 15: p53 nach neuer WHO 2014	61
Tabelle 16: Laut WHO 2014 Zwischenstufen: nicht p53-mutiert.....	62
Tabelle 17: p16 nach klassischem IRS.....	62
Tabelle 18: p16- prozentualer Anteil gefärbter Kerne	62
Tabelle 19: p16 nach dreistufigem Score anhand der Färbeintensität.....	62
Tabelle 20: p16 nach neuer WHO 2014	63
Tabelle 21: Übersicht KRAS-Mutationen	66
Tabelle 22: Gesamtübersicht Ergebnisse IHC und Mutationsanalysen	70

7.2.9 Literaturverzeichnis

- Acs, G. (2005). Serous and mucinous borderline (low malignant potential) tumors of the ovary. *Am J Clin Pathol*, 123 Suppl, S13-57.
- Altman, A. D., Nelson, G. S., Ghatage, P., McIntyre, J. B., Capper, D., Chu, P., . . . Kobel, M. (2013). The diagnostic utility of TP53 and CDKN2A to distinguish ovarian high-grade serous carcinoma from low-grade serous ovarian tumors. *Mod Pathol*, 26(9), 1255-1263. doi:10.1038/modpathol.2013.55
- Alvero, A. B., Chen, R., Fu, H. H., Montagna, M., Schwartz, P. E., Rutherford, T., . . . Mor, G. (2009). Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle*, 8(1), 158-166. doi:10.4161/cc.8.1.7533
- An, S., Yang, Y., Ward, R., Liu, Y., Guo, X. X., & Xu, T. R. (2015). A-Raf: A new star of the family of raf kinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50(6), 520-531. doi:10.3109/10409238.2015.1102858
- Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A. B., & Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett*, 267(1), 133-164. doi:10.1016/j.canlet.2008.03.025
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., . . . Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, 72(5), 1117-1130. doi:10.1086/375033
- Aravidis, C., Panani, A. D., Kosmaidou, Z., Thomakos, N., Rodolakis, A., & Antsaklis, A. (2012). Detection of numerical abnormalities of chromosome 9 and p16/CDKN2A gene alterations in ovarian cancer with fish analysis. *Anticancer Res*, 32(12), 5309-5313.
- Ardighieri, L., Zeppernick, F., Hannibal, C. G., Vang, R., Cope, L., Junge, J., . . . Shih, M. (2014). Mutational analysis of BRAF and KRAS in ovarian serous borderline (atypical proliferative) tumours and associated peritoneal implants. *J Pathol*, 232(1), 16-22. doi:10.1002/path.4293
- Arnaudeau, C., Helleday, T., & Jenssen, D. (1999). The RAD51 protein supports homologous recombination by an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol*, 289(5), 1231-1238. doi:10.1006/jmbi.1999.2856
- Avruch, J., Khokhlatchev, A., Kyriakis, J. M., Luo, Z., Tzivion, G., Vavvas, D., & Zhang, X. F. (2001). Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res*, 56, 127-155.

- Ayhan, A., Kurman, R. J., Yemelyanova, A., Vang, R., Logani, S., Seidman, J. D., & Shih Ie, M. (2009). Defining the cut point between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: a clinicopathologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol*, 33(8), 1220-1224. doi:10.1097/PAS.0b013e3181a24354
- Bali, A., O'Brien, P. M., Edwards, L. S., Sutherland, R. L., Hacker, N. F., & Henshall, S. M. (2004). Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 10(15), 5168-5177. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0751
- Bast, R. C., Jr., Hennessey, B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2644
- Beavis, A. L., Smith, A. J., & Fader, A. N. (2016). Lifestyle changes and the risk of developing endometrial and ovarian cancers: opportunities for prevention and management. *Int J Womens Health*, 8, 151-167. doi:10.2147/ijwh.s88367
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 961-976. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.013
- Berliner Tumorzentrum TMZ. (2012). *Eierstockkrebs und Bauchfellkrebs*. Paper presented at the 3. Berliner Tag zum Eierstockkrebs und Bauchfellkrebs, Berlin.
- Bernard-Gallon, D. J., De Latour, M. P., Sylvain, V., Vissac, C., Aunoble, B., Chassagne, J., & Bignon, Y. J. (2001). Brca1 and Brca2 protein expression patterns in different tissues of murine origin. *Int J Oncol*, 18(2), 271-280.
- Bixel, K., & Hays, J. L. (2015). Olaparib in the management of ovarian cancer. *Pharmgenomics Pers Med*, 8, 127-135. doi:10.2147/pgpm.s62809
- Bodurka, D. C., Deavers, M. T., Tian, C., Sun, C. C., Malpica, A., Coleman, R. L., . . . Gershenson, D. M. (2012). Reclassification of serous ovarian carcinoma by a 2-tier system: a Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer*, 118(12), 3087-3094. doi:10.1002/cncr.26618
- Boonstra, J., Rijken, P., Humbel, B., Cremers, F., Verkleij, A., & van Bergen en Henegouwen, P. (1995). The epidermal growth factor. *Cell Biol Int*, 19(5), 413-430.
- Bornstein, E., & Jimeno, A. (2016). Olaparib for the treatment of ovarian cancer. *Drugs Today (Barc)*, 52(1), 17-28. doi:10.1358/dot.2016.52.1.2440714

- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49(17), 4682-4689.
- Boyd, C., & McCluggage, W. G. (2012). Low-grade ovarian serous neoplasms (low-grade serous carcinoma and serous borderline tumor) associated with high-grade serous carcinoma or undifferentiated carcinoma: report of a series of cases of an unusual phenomenon. *Am J Surg Pathol*, 36(3), 368-375. doi:10.1097/PAS.0b013e31823732a9
- Brose, M. S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Guerrero, I., . . . Weber, B. L. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*, 62(23), 6997-7000.
- Buisson, R., Dion-Cote, A. M., Coulombe, Y., Launay, H., Cai, H., Stasiak, A. Z., . . . Masson, J. Y. (2010). Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 17(10), 1247-1254. doi:10.1038/nsmb.1915
- Burger, R. A., Brady, M. F., Bookman, M. A., Fleming, G. F., Monk, B. J., Huang, H., . . . Liang, S. X. (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*, 365(26), 2473-2483. doi:10.1056/NEJMoa1104390
- Buys, S. S., Partridge, E., Black, A., Johnson, C. C., Lamerato, L., Isaacs, C., . . . Berg, C. D. (2011). Effect of screening on ovarian cancer mortality: the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Randomized Controlled Trial. *Jama*, 305(22), 2295-2303. doi:10.1001/jama.2011.766
- Chabner, B. A., & Roberts, T. G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(1), 65-72. doi:10.1038/nrc1529
- Chang, C. J., Chao, C. H., Xia, W., Yang, J. Y., Xiong, Y., Li, C. W., . . . Hung, M. C. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nat Cell Biol*, 13(3), 317-323. doi:10.1038/ncb2173
- Chang, F., Syrjanen, S., & Syrjanen, K. (1995). Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. *J Clin Oncol*, 13(4), 1009-1022.
- Chang, S. J., & Bristow, R. E. (2015). Surgical technique of en bloc pelvic resection for advanced ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*, 26(2), 155. doi:10.3802/jgo.2015.26.2.155
- Chase, D. M., Patel, S., & Shields, K. (2016). Profile of olaparib in the treatment of advanced ovarian cancer. *Int J Womens Health*, 8, 125-129. doi:10.2147/ijwh.s55906

- Chen, E. Y., Mehra, K., Mehrad, M., Ning, G., Miron, A., Mutter, G. L., . . . Crum, C. P. (2010). Secretory cell outgrowth, PAX2 and serous carcinogenesis in the Fallopian tube. *J Pathol*, 222(1), 110-116. doi:10.1002/path.2739
- Chen, J., Lin, J., & Levine, A. J. (1995). Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med*, 1(2), 142-152.
- Chen, M., Jin, Y., Bi, Y., Yin, J., Wang, Y., & Pan, L. (2014). A survival analysis comparing women with ovarian low-grade serous carcinoma to those with high-grade histology. *Onco Targets Ther*, 7, 1891-1899. doi:10.2147/ott.s67812
- Cho, K. R., & Shih Ie, M. (2009). Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 4, 287-313. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246
- Corney, D. C., Flesken-Nikitin, A., Choi, J., & Nikitin, A. Y. (2008). Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol*, 622, 99-117. doi:10.1007/978-0-387-68969-2_9
- Coulet, F., Fajac, A., Colas, C., Eyries, M., Dion-Miniere, A., Rouzier, R., . . . Soubrier, F. (2013). Germline RAD51C mutations in ovarian cancer susceptibility. *Clin Genet*, 83(4), 332-336. doi:10.1111/j.1399-0004.2012.01917.x
- Creasman, W. T., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, M. A., Beller, U., Benedet, J. L., . . . Pecorelli, S. (2006). Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, 95 Suppl 1, S105-143. doi:10.1016/s0020-7292(06)60031-3
- Cunningham, J. M., Cicek, M. S., Larson, N. B., Davila, J., Wang, C., Larson, M. C., . . . Goode, E. L. (2014). Clinical characteristics of ovarian cancer classified by BRCA1, BRCA2, and RAD51C status. *Sci Rep*, 4, 4026. doi:10.1038/srep04026
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., . . . Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954. doi:10.1038/nature00766
- Dehari, R., Kurman, R. J., Logani, S., & Shih Ie, M. (2007). The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol*, 31(7), 1007-1012. doi:10.1097/PAS.0b013e31802cbb9
- Denny, L., Quinn, M., & Hacker, N. (2012). FIGO Cancer Report 2012. *Int J Gynaecol Obstet*, 119 Suppl 2, S89. doi:10.1016/s0020-7292(12)00458-4

- Destatis, S. B. D. (2014). "Sterbefälle insgesamt nach den 10 häufigsten Todesursachen der ICD-10". Retrieved from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Krebserkrankungen.html>
- DeVita, V. T., Jr., & Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res*, 68(21), 8643-8653. doi:10.1158/0008-5472.can-07-6611
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., & Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), 3279-3290. doi:10.1038/sj.onc.1210421
- Diebold, J. (1998). [Molecular genetics of epithelial ovarian neoplasms: correlations with phenotype and biological behavior]. *Pathologe*, 19(2), 95-103.
- Diebold, J., Seemuller, F., & Lohrs, U. (2003). K-RAS mutations in ovarian and extraovarian lesions of serous tumors of borderline malignancy. *Lab Invest*, 83(2), 251-258.
- du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., & Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115(6), 1234-1244. doi:10.1002/cncr.24149
- Easton, D. F., Ford, D., & Bishop, D. T. (1995). Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 56(1), 265-271.
- Edge, S. B., & Compton, C. C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol*, 17(6), 1471-1474. doi:10.1245/s10434-010-0985-4
- Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., . . . Futreal, P. A. (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 5(8), 928-932.
- Ekumi, K. M., Paculova, H., Lenasi, T., Pospichalova, V., Bosken, C. A., Rybarikova, J., . . . Barboric, M. (2015). Ovarian carcinoma CDK12 mutations misregulate expression of DNA repair genes via deficient formation and function of the Cdk12/CycK complex. *Nucleic Acids Res*, 43(5), 2575-2589. doi:10.1093/nar/gkv101
- English, D. P., Roque, D. M., & Santin, A. D. (2013). HER2 expression beyond breast cancer: therapeutic implications for gynecologic malignancies. *Mol Diagn Ther*, 17(2), 85-99. doi:10.1007/s40291-013-0024-9

- Evans, D. G., Clayton, R., Donnai, P., Shenton, A., & Laloo, F. (2009). Risk-reducing surgery for ovarian cancer: outcomes in 300 surgeries suggest a low peritoneal primary risk. *Eur J Hum Genet*, 17(11), 1381-1385. doi:10.1038/ejhg.2009.60
- Feeley, K. M., & Wells, M. (2001). Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. *Histopathology*, 38(2), 87-95.
- Fischerova, D., Zikan, M., Dundr, P., & Cibula, D. (2012). Diagnosis, treatment, and follow-up of borderline ovarian tumors. *Oncologist*, 17(12), 1515-1533. doi:10.1634/theoncologist.2012-0139
- Forbes, S., Clements, J., Dawson, E., Bamford, S., Webb, T., Dogan, A., . . . Stratton, M. R. (2006). COSMIC 2005. *Br J Cancer*, 94(2), 318-322. doi:10.1038/sj.bjc.6602928
- Ford, D., Easton, D. F., Stratton, M., Narod, S., Goldgar, D., Devilee, P., . . . et al. (1998). Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 62(3), 676-689.
- Foulkes, W. D. (2013). Preventing ovarian cancer by salpingectomy. *Curr Oncol*, 20(3), 139-142. doi:10.3747/co.20.1613
- Frampton, J. E. (2015). Olaparib: a review of its use as maintenance therapy in patients with ovarian cancer. *BioDrugs*, 29(2), 143-150. doi:10.1007/s40259-015-0125-6
- Friedenson, B. (2007). The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*, 7, 152. doi:10.1186/1471-2407-7-152
- Fujita, M., Enomoto, T., Haba, T., Nakashima, R., Sasaki, M., Yoshino, K., . . . Murata, Y. (1997). Alteration of p16 and p15 genes in common epithelial ovarian tumors. *Int J Cancer*, 74(2), 148-155.
- Fukui, K. (2010). DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *Journal of nucleic acids*. doi:10.4061/2010/260512
- Gemignani, M. L., Schlaerth, A. C., Bogomolnii, F., Barakat, R. R., Lin, O., Soslow, R., . . . Boyd, J. (2003). Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 90(2), 378-381.
- Gerlinger, M., McGranahan, N., Dewhurst, S. M., Burrell, R. A., Tomlinson, I., & Swanton, C. (2014). Cancer: evolution within a lifetime. *Annu Rev Genet*, 48, 215-236. doi:10.1146/annurev-genet-120213-092314

- Graeser, M. K., Engel, C., Rhiem, K., Gadzicki, D., Bick, U., Kast, K., . . . Schmutzler, R. K. (2009). Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Clin Oncol*, 27(35), 5887-5892. doi:10.1200/jco.2008.19.9430
- Greaves, M. (2015). Evolutionary determinants of cancer. *Cancer Discov*, 5(8), 806-820. doi:10.1158/2159-8290.cd-15-0439
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., & Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, 16(3), 859-867.
- Hartmann & Mayr et al. (2015). *Anwendung eines Tumorgraduierungssystems bei Ovarialkarzinomen und Überprüfung der molekularen Relevanz: Retrospektive Untersuchung an einem großen Patientenkollektiv mit Korrelation zu klinischen Daten sowie zum Überleben.* (Dr. med.), Ludwig-Maximilians-Universität München. Retrieved from https://edoc.ub.uni-muenchen.de/19048/1/Hartmann_Sebastian.pdf
- Hashiguchi, Y., Tsuda, H., Yamamoto, K., Inoue, T., Ishiko, O., & Ogita, S. (2001). Combined analysis of p53 and RB pathways in epithelial ovarian cancer. *Hum Pathol*, 32(9), 988-996. doi:10.1053/hupa.2001.27115
- Hedau, S., Batra, M., Singh, U. R., Bharti, A. C., Ray, A., & Das, B. C. (2015). Expression of BRCA1 and BRCA2 proteins and their correlation with clinical staging in breast cancer. *J Cancer Res Ther*, 11(1), 158-163. doi:10.4103/0973-1482.140985
- Hilger, R. A., Scheulen, M. E., & Strumberg, D. (2002). The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie*, 25(6), 511-518. doi:68621
- Holthausen, J. T., Wyman, C., & Kanaar, R. (2010). Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 9(12), 1264-1272. doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.014
- Janakiraman, M., Vakiani, E., Zeng, Z., Pratilas, C. A., Taylor, B. S., Chitale, D., . . . Solit, D. B. (2010). Genomic and biological characterization of exon 4 KRAS mutations in human cancer. *Cancer Res*, 70(14), 5901-5911. doi:10.1158/0008-5472.can-10-0192
- Jarboe, E., Folkins, A., Nucci, M. R., Kindelberger, D., Drapkin, R., Miron, A., . . . Crum, C. P. (2008). Serous carcinogenesis in the fallopian tube: a descriptive

- classification. *Int J Gynecol Pathol*, 27(1), 1-9.
doi:10.1097/pgp.0b013e31814b191f
- Kaas, R., Verhoef, S., Wesseling, J., Rookus, M. A., Oldenburg, H. S., Peeters, M. J., & Rutgers, E. J. (2010). Prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: very low risk for subsequent breast cancer. *Ann Surg*, 251(3), 488-492. doi:10.1097/SLA.0b013e3181c3c36d
- Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., & Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc*, 36(1), 9-17. doi:10.1007/s007950300002
- Kaminski, K., Putowski, L., & Oleszczuk, J. (2003). [Expression P53 protein and chromosome aberrations in benign tumors and ovarian carcinoma]. *Ginekol Pol*, 74(9), 741-745.
- Kauff, N. D., Domchek, S. M., Friebel, T. M., Robson, M. E., Lee, J., Garber, J. E., . . . Rebbeck, T. R. (2008). Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol*, 26(8), 1331-1337. doi:10.1200/jco.2007.13.9626
- Kindelberger, D. W., Lee, Y., Miron, A., Hirsch, M. S., Feltmate, C., Medeiros, F., . . . Crum, C. P. (2007). Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: Evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol*, 31(2), 161-169. doi:10.1097/01.pas.0000213335.40358.47
- King, M. C., Marks, J. H., & Mandell, J. B. (2003). Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645), 643-646. doi:10.1126/science.1088759
- Kmet, L. M., Cook, L. S., & Magliocco, A. M. (2003). A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors. *Cancer*, 97(2), 389-404. doi:10.1002/cncr.11064
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4), 820-823.
- Kohler, M. F., Berchuck, A., Davidoff, A. M., Humphrey, P. A., Dodge, R. K., Iglehart, J. D., . . . Marks, J. R. (1992). Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res*, 52(6), 1622-1627.
- Kohn, E. C., & Ivy, S. P. (2017). Whence High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 37, 443-448. doi:10.14694/edbk_174718

- Koshiyama, M., Matsumura, N., & Konishi, I. (2014). Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int*, 2014, 934261. doi:10.1155/2014/934261
- Kupryjanczyk, J., Bell, D. A., Dimeo, D., Beauchamp, R., Thor, A. D., & Yandell, D. W. (1995). p53 gene analysis of ovarian borderline tumors and stage I carcinomas. *Hum Pathol*, 26(4), 387-392.
- Kupryjanczyk, J., Thor, A. D., Beauchamp, R., Merritt, V., Edgerton, S. M., Bell, D. A., & Yandell, D. W. (1993). p53 gene mutations and protein accumulation in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11), 4961-4965.
- Kurman, R. J. (2013). Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Ann Oncol*, 24 Suppl 10, x16-21. doi:10.1093/annonc/mdt463
- Kurman, R. J., & Carcangiu ML, H. C., Young RH. (2014). *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs* (4th Edition ed. Vol. Volume 6).
- Kurman, R. J., & Shih Ie, M. (2010). The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, 34(3), 433-443. doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79
- Kurman, R. J., & Shih Ie, M. (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 42(7), 918-931. doi:10.1016/j.humpath.2011.03.003
- Ledermann, J., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., . . . Matulonis, U. (2014). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 15(8), 852-861. doi:10.1016/s1470-2045(14)70228-1
- Lee, S. W., Park, S. M., Kim, Y. M., Kim, Y. S., Choi, E. K., Kim, D. Y., . . . Kim, Y. T. (2011). Radiation therapy is a treatment to be considered for recurrent epithelial ovarian cancer after chemotherapy. *Tumori*, 97(5), 590-595. doi:10.1700/989.10717
- Lee, Y., Miron, A., Drapkin, R., Nucci, M. R., Medeiros, F., Saleemuddin, A., . . . Crum, C. P. (2007). A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol*, 211(1), 26-35. doi:10.1002/path.2091
- Leonhardt, K., Eibenkel, J., Sohr, S., Engeland, K., & Horn, L. C. (2011). p53 signature and serous tubal in-situ carcinoma in cases of primary tubal and peritoneal carcinomas and serous borderline tumors of the ovary. *Int J Gynecol Pathol*, 30(5), 417-424. doi:10.1097/PGP.0b013e318216d447

- Li, H. X., Lu, Z. H., Shen, K., Cheng, W. J., Malpica, A., Zhang, J., . . . Liu, J. (2014). Advances in serous tubal intraepithelial carcinoma: correlation with high grade serous carcinoma and ovarian carcinogenesis. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(3), 848-857.
- Li, J., Fadare, O., Xiang, L., Kong, B., & Zheng, W. (2012). Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis. *J Hematol Oncol*, 5, 8. doi:10.1186/1756-8722-5-8
- Malpica, A., Deavers, M. T., Lu, K., Bodurka, D. C., Atkinson, E. N., Gershenson, D. M., & Silva, E. G. (2004). Grading ovarian serous carcinoma using a two-tier system. *Am J Surg Pathol*, 28(4), 496-504.
- Malpica, A., Deavers, M. T., Tornos, C., Kurman, R. J., Soslow, R., Seidman, J. D., . . . Silva, E. G. (2007). Interobserver and intraobserver variability of a two-tier system for grading ovarian serous carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 31(8), 1168-1174. doi:10.1097/PAS.0b013e31803199b0
- Marks, J. R., Davidoff, A. M., Kerns, B. J., Humphrey, P. A., Pence, J. C., Dodge, R. K., . . . Berchuck, A. (1991). Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 51(11), 2979-2984.
- Marshall, M. (1995). Interactions between Ras and Raf: key regulatory proteins in cellular transformation. *Mol Reprod Dev*, 42(4), 493-499. doi:10.1002/mrd.1080420418
- Matulonis, U. A., Harter, P., Gourley, C., Friedlander, M., Vergote, I., Rustin, G., . . . Ledermann, J. A. (2016). Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed serous ovarian cancer and a BRCA mutation: Overall survival adjusted for postprogression poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibitor therapy. *Cancer*, 122(12), 1844-1852. doi:10.1002/cncr.29995
- Mayr, D., Hirschmann, A., Lohrs, U., & Diebold, J. (2006). KRAS and BRAF mutations in ovarian tumors: a comprehensive study of invasive carcinomas, borderline tumors and extraovarian implants. *Gynecol Oncol*, 103(3), 883-887. doi:10.1016/j.ygyno.2006.05.029
- Mazoyer, S. (2005). Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Hum Mutat*, 25(5), 415-422. doi:10.1002/humu.20169
- McCluggage, W. G. (2008). My approach to and thoughts on the typing of ovarian carcinomas. *J Clin Pathol*, 61(2), 152-163. doi:10.1136/jcp.2007.049478
- McCluggage, W. G. (2011). Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology*, 43(5), 420-432. doi:10.1097/PAT.0b013e328348a6e7

- McMillen, B. D., Aponte, M. M., Liu, Z., Helenowski, I. B., Scholtens, D. M., Buttin, B. M., & Wei, J. J. (2012). Expression analysis of MIR182 and its associated target genes in advanced ovarian carcinoma. *Mod Pathol*, 25(12), 1644-1653. doi:10.1038/modpathol.2012.118
- Meehan, R. S., & Chen, A. P. (2016). New treatment option for ovarian cancer: PARP inhibitors. *Gynecol Oncol Res Pract*, 3, 3. doi:10.1186/s40661-016-0024-7
- Mehra, K., Mehrad, M., Ning, G., Drapkin, R., McKeon, F. D., Xian, W., & Crum, C. P. (2011). STICS, SCOUTs and p53 signatures; a new language for pelvic serous carcinogenesis. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 625-634.
- Meinhold-Heerlein, I., Fotopoulou, C., Harter, P., Kurzeder, C., Mustea, A., Wimberger, P., . . . Sehouli, J. (2016). The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*, 293(4), 695-700. doi:10.1007/s00404-016-4035-8
- Milea, A., George, S. H., Matevski, D., Jiang, H., Madunic, M., Berman, H. K., . . . Shaw, P. A. (2014). Retinoblastoma pathway deregulatory mechanisms determine clinical outcome in high-grade serous ovarian carcinoma. *Mod Pathol*, 27(7), 991-1001. doi:10.1038/modpathol.2013.218
- Muallem, M. Z., Gasimli, K., Richter, R., Almuheimid, J., Nasser, S., Braicu, E. I., & Sehouli, J. (2015). AGO Score As a Predictor of Surgical Outcome at Secondary Cytoreduction in Patients with Ovarian Cancer. *Anticancer Res*, 35(6), 3423-3429.
- Mueller, S., & Sehouli, J. e. a. (2006). Laienätiologische Vorstellungen bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Ergebnisse einer monozentrischen Untersuchung. *Geburtsh Frauenheilk* 2006; 66:359-364;
- Lay Causal Attributions in Patients with Ovarian Cancer. Results of a Single Center Study (pp. 66(64): 359-364). Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart.
- Murcia, O., Juarez, M., Hernandez-Illan, E., Egoavil, C., Giner-Calabuig, M., Rodriguez-Soler, M., & Jover, R. (2016). Serrated colorectal cancer: Molecular classification, prognosis, and response to chemotherapy. *World J Gastroenterol*, 22(13), 3516-3530. doi:10.3748/wjg.v22.i13.3516
- Nagle, C. M., Bain, C. J., Green, A. C., & Webb, P. M. (2008). The influence of reproductive and hormonal factors on ovarian cancer survival. *Int J Gynecol Cancer*, 18(3), 407-413. doi:10.1111/j.1525-1438.2007.01031.x
- Nakayama, K., Nakayama, N., Kurman, R. J., Cope, L., Pohl, G., Samuels, Y., . . . Shih le, M. (2006). Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther*, 5(7), 779-785.

- Nazlioglu, H. O., Ercan, I., Bilgin, T., & Ozuysal, S. (2010). Expression of p16 in serous ovarian neoplasms. *Eur J Gynaecol Oncol*, 31(3), 312-314.
- NCCN, C. P. G. (2015). *Ovarian Cancer Including Fallopian Tube Cancer and Primary Peritoneal Cancer* (Vol. Version 2.2015).
- Nichols, K. E., Malkin, D., Garber, J. E., Fraumeni, J. F., Jr., & Li, F. P. (2001). Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(2), 83-87.
- O'Neill, C. J., Deavers, M. T., Malpica, A., Foster, H., & McCluggage, W. G. (2005). An immunohistochemical comparison between low-grade and high-grade ovarian serous carcinomas: significantly higher expression of p53, MIB1, BCL2, HER-2/neu, and C-KIT in high-grade neoplasms. *Am J Surg Pathol*, 29(8), 1034-1041.
- O'Neill, C. J., McBride, H. A., Connolly, L. E., Deavers, M. T., Malpica, A., & McCluggage, W. G. (2007). High-grade ovarian serous carcinoma exhibits significantly higher p16 expression than low-grade serous carcinoma and serous borderline tumour. *Histopathology*, 50(6), 773-779. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02682.x
- Offermanns S. and Rosenthal W. (2008). *Encyclopedia of Molecular Pharmacology, 2nd Edition*: Springer- Verlag.
- Olopade, O. I., & Artioli, G. (2004). Efficacy of risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with BRCA-1 and BRCA-2 mutations. *Breast J*, 10 Suppl 1, S5-9.
- Olsen, C. M., Green, A. C., Whiteman, D. C., Sadeghi, S., Kolahdooz, F., & Webb, P. M. (2007). Obesity and the risk of epithelial ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*, 43(4), 690-709. doi:10.1016/j.ejca.2006.11.010
- Oza, A. M., Cibula, D., Benzaquen, A. O., Poole, C., Mathijssen, R. H., Sonke, G. S., . . . Friedlander, M. (2015). Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 16(1), 87-97. doi:10.1016/s1470-2045(14)71135-0
- Pal, T., Permuth-Wey, J., Betts, J. A., Krischer, J. P., Fiorica, J., Arango, H., . . . Sutphen, R. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*, 104(12), 2807-2816. doi:10.1002/cncr.21536
- Parker, R. L., Clement, P. B., Chercover, D. J., Sornarajah, T., & Gilks, C. B. (2004). Early recurrence of ovarian serous borderline tumor as high-grade carcinoma: a report of two cases. *Int J Gynecol Pathol*, 23(3), 265-272.

- Peurala, E., Koivunen, P., Haapasaari, K. M., Bloigu, R., & Jukkola-Vuorinen, A. (2013). The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. *Breast Cancer Res*, 15(1), R5. doi:10.1186/bcr3376
- Phillips, V., Kelly, P., & McCluggage, W. G. (2009). Increased p16 expression in high-grade serous and undifferentiated carcinoma compared with other morphologic types of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 28(2), 179-186. doi:10.1097/PGP.0b013e318182c2d2
- Piskunova, T. S., Yurova, M. N., Ovsyannikov, A. I., Semenchenko, A. V., Zabezhinski, M. A., Popovich, I. G., . . . Anisimov, V. N. (2008). Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr Gerontol Geriatr Res*, 754190. doi:10.1155/2008/754190
- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W., & Jasin, M. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(4), a016600. doi:10.1101/cshperspect.a016600
- Prat, J. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 124(1), 1-5. doi:10.1016/j.ijgo.2013.10.001
- Prat, J., Ribe, A., & Gallardo, A. (2005). Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol*, 36(8), 861-870. doi:10.1016/j.humpath.2005.06.006
- Proctor and Gray. (2008). The p53-Mdm2 System. Retrieved from <http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/static-pages.do?page=ModelMonth%2F2009-02>
- Przybycin, C. G., Kurman, R. J., Ronnett, B. M., Shih Ie, M., & Vang, R. (2010). Are all pelvic (nonuterine) serous carcinomas of tubal origin? *Am J Surg Pathol*, 34(10), 1407-1416. doi:10.1097/PAS.0b013e3181ef7b16
- Purdie, D. M., Bain, C. J., Siskind, V., Webb, P. M., & Green, A. C. (2003). Ovulation and risk of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 104(2), 228-232. doi:10.1002/ijc.10927
- Quartuccio, S. M., Karthikeyan, S., Eddie, S. L., Lantvit, D. D., E, O. h., Modi, D. A., . . . Burdette, J. E. (2015). Mutant p53 expression in fallopian tube epithelium drives cell migration. *Int J Cancer*, 137(7), 1528-1538. doi:10.1002/ijc.29528
- Quddus, M. R., Rashid, L. B., Hansen, K., Sung, C. J., & Lawrence, W. D. (2009). High-grade serous carcinoma arising in a low-grade serous carcinoma and micropapillary serous borderline tumour of the ovary in a 23-year-old woman. *Histopathology*, 54(6), 771-773. doi:10.1111/j.1365-2559.2009.03283.x

- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*, 130(8), 1715-1725. doi:10.1002/ijc.27316
- Reade, C. J., McVey, R. M., Tone, A. A., Finlayson, S. J., McAlpine, J. N., Fung-Kee-Fung, M., & Ferguson, S. E. (2014). The fallopian tube as the origin of high grade serous ovarian cancer: review of a paradigm shift. *J Obstet Gynaecol Can*, 36(2), 133-140.
- Reade, C. J., Riva, J. J., Busse, J. W., Goldsmith, C. H., & Elit, L. (2013). Risks and benefits of screening asymptomatic women for ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 130(3), 674-681. doi:10.1016/j.ygyno.2013.06.029
- Rechsteiner, M., Zimmermann, A. K., Wild, P. J., Caduff, R., von Teichman, A., Fink, D., . . . Noske, A. (2013). TP53 mutations are common in all subtypes of epithelial ovarian cancer and occur concomitantly with KRAS mutations in the mucinous type. *Exp Mol Pathol*, 95(2), 235-241. doi:10.1016/j.yexmp.2013.08.004
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3), 138-140.
- Ribas, A., Gonzalez, R., Pavlick, A., Hamid, O., Gajewski, T. F., Daud, A., . . . McArthur, G. A. (2014). Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAF(V600)-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol*, 15(9), 954-965. doi:10.1016/s1470-2045(14)70301-8
- Riede & Schaefer et. al. (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie* (Vol. 5. komplett überarbeitete Ausgabe): Georg Thieme Verlag; Stuttgart, 2004.
- Risch, H. A., McLaughlin, J. R., Cole, D. E., Rosen, B., Bradley, L., Fan, I., . . . Narod, S. A. (2006). Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst*, 98(23), 1694-1706. doi:10.1093/jnci/djj465
- Robert Koch-Institut, Z. f. K., Berlin. (2015, 17.12.2015). Epidemiologische Daten Eierstockkrebs. Retrieved from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Ovarialkrebs/ovarialkrebs_node.html
- Rosen, L. S., LoRusso, P., Ma, W. W., Goldman, J. W., Weise, A., Colevas, A. D., . . . Sikic, B. I. (2016). A first-in-human phase I study to evaluate the MEK1/2 inhibitor, cobimetinib, administered daily in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*. doi:10.1007/s10637-016-0374-3

- S. Hartmann & D. Mayr et al., A. J., T. Kirchner. (2013). *Comparison of the newly proposed two-tier grading system with the three-tier system in ovarian cancer [...]*.
- Salani, R., Axtell, A., Gerardi, M., Holschneider, C., & Bristow, R. E. (2008). Limited utility of conventional criteria for predicting unresectable disease in patients with advanced stage epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 108(2), 271-275. doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.004
- Schlehe, B., & Schmutzler, R. (2008). [Hereditary breast cancer]. *Chirurg*, 79(11), 1047-1054. doi:10.1007/s00104-008-1556-0
- Schrader, K. A., Hurlburt, J., Kalloger, S. E., Hansford, S., Young, S., Huntsman, D. G., . . . McAlpine, J. N. (2012). Germline BRCA1 and BRCA2 mutations in ovarian cancer: utility of a histology-based referral strategy. *Obstet Gynecol*, 120(2 Pt 1), 235-240. doi:10.1097/AOG.0b013e31825f3576
- Serov & Scully et al., S. L. H., World Health Organisation. (1973). *Histological typing of ovarian tumours*: Geneva: World Health Organisation.
- Shih le, M., & Kurman, R. J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 164(5), 1511-1518.
- Singer, G., Oldt, R., 3rd, Cohen, Y., Wang, B. G., Sidransky, D., Kurman, R. J., & Shih le, M. (2003). Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 95(6), 484-486.
- Skomedal, H., Kristensen, G. B., Abeler, V. M., Borresen-Dale, A. L., Trope, C., & Holm, R. (1997). TP53 protein accumulation and gene mutation in relation to overexpression of MDM2 protein in ovarian borderline tumours and stage I carcinomas. *J Pathol*, 181(2), 158-165. doi:10.1002/(sici)1096-9896(199702)181:2<158::aid-path742>3.0.co;2-8
- Stäbler & Diebold. (2005). Molekularpathologie der epithelialen Ovarialneoplasien. *Pathologe*.
- Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther*, 1(2), 1-4. doi:10.4172/1948-5956.100000e2
- Surget, S., Khoury, M. P., & Bourdon, J. C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*, 7, 57-68. doi:10.2147/ott.s53876
- The Cancer Genome Atlas TCGA. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609-615. doi:10.1038/nature10166

- Toss, A., Tomasello, C., Razzaboni, E., Contu, G., Grandi, G., Cagnacci, A., . . . Cortesi, L. (2015). Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int*, 2015, 341723. doi:10.1155/2015/341723
- Trope, C. G., Kaern, J., & Davidson, B. (2012). Borderline ovarian tumours. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 26(3), 325-336. doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.12.006
- Tsang, Y. T., Deavers, M. T., Sun, C. C., Kwan, S. Y., Kuo, E., Malpica, A., . . . Wong, K. K. (2013). KRAS (but not BRAF) mutations in ovarian serous borderline tumour are associated with recurrent low-grade serous carcinoma. *J Pathol*, 231(4), 449-456. doi:10.1002/path.4252
- Vakiani, E., & Solit, D. B. (2011). KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*, 223(2), 219-229. doi:10.1002/path.2796
- Van Berckelaer, C., Brouwers, A. J., Peeters, D. J., Tjalma, W., Trinh, X. B., & van Dam, P. A. (2016). Current and future role of circulating tumor cells in patients with epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol*. doi:10.1016/j.ejso.2016.05.010
- Vang, R., Shih Ie, M., & Kurman, R. J. (2009). Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*, 16(5), 267-282. doi:10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa
- Vereczkey, I., Serester, O., Dobos, J., Gallai, M., Szakacs, O., Szentirmay, Z., & Toth, E. (2011). Molecular characterization of 103 ovarian serous and mucinous tumors. *Pathol Oncol Res*, 17(3), 551-559. doi:10.1007/s12253-010-9345-8
- Vochem, R., Eibenkel, J., Horn, L. C., & Ruschpler, P. (2014). [Importance of the tumor stem cell hypothesis for understanding ovarian cancer]. *Pathologe*, 35(4), 361-370. doi:10.1007/s00292-014-1910-6
- Wang, Z. C., Birkbak, N. J., Culhane, A. C., Drapkin, R., Fatima, A., Tian, R., . . . Matulonis, U. A. (2012). Profiles of genomic instability in high-grade serous ovarian cancer predict treatment outcome. *Clin Cancer Res*, 18(20), 5806-5815. doi:10.1158/1078-0432.ccr-12-0857
- Watkin, E., & Devouassoux-Shisheboran, M. (2011). [Fallopian tube: the dark face of pelvic carcinogenesis]. *Ann Pathol*, 31(5), 345-352. doi:10.1016/j.annpat.2011.06.008
- Welsh, P. L., & King, M. C. (2001). BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*, 10(7), 705-713.

- Wong, K. K., Tsang, Y. T., Deavers, M. T., Mok, S. C., Zu, Z., Sun, C., . . . Gershenson, D. M. (2010). BRAF mutation is rare in advanced-stage low-grade ovarian serous carcinomas. *Am J Pathol*, 177(4), 1611-1617. doi:10.2353/ajpath.2010.100212
- Wu, R., Baker, S. J., Hu, T. C., Norman, K. M., Fearon, E. R., & Cho, K. R. (2013). Type I to type II ovarian carcinoma progression: mutant Trp53 or Pik3ca confers a more aggressive tumor phenotype in a mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol*, 182(4), 1391-1399. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.031
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7(7a), 1126-1132.
- Yang-Hartwich, Y., Gurrea-Soteras, M., Sumi, N., Joo, W. D., Holmberg, J. C., Craveiro, V., . . . Mor, G. (2014). Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Sci Rep*, 4, 6116. doi:10.1038/srep06116
- Yang, M., Liu, P., & Huang, P. (2016). Cancer stem cells, metabolism, and therapeutic significance. *Tumour Biol*, 37(5), 5735-5742. doi:10.1007/s13277-016-4945-x
- Yemelyanova, A., Vang, R., Kshirsagar, M., Lu, D., Marks, M. A., Shih le, M., & Kurman, R. J. (2011). Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol*, 24(9), 1248-1253. doi:10.1038/modpathol.2011.85
- Yokoyama, Y., & Mizunuma, H. (2013). Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy. *World J Clin Cases*, 1(6), 187-190. doi:10.12998/wjcc.v1.i6.187
- Zhang, M., Zhuang, G., Sun, X., Shen, Y., Wang, W., Li, Q., & Di, W. (2017). TP53 mutation-mediated genomic instability induces the evolution of chemoresistance and recurrence in epithelial ovarian cancer. *Diagn Pathol*, 12(1), 16. doi:10.1186/s13000-017-0605-8
- Zheng, J., Benedict, W. F., Xu, H. J., Hu, S. X., Kim, T. M., Velicescu, M., . . . Dubeau, L. (1995). Genetic disparity between morphologically benign cysts contiguous to ovarian carcinomas and solitary cystadenomas. *J Natl Cancer Inst*, 87(15), 1146-1153.